

**Die Bedeutung von Myo5 für das polare
Wachstum, die pathogene Entwicklung und
den Transport polarer Chitinsynthasen
in *Ustilago maydis***

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Isabella Weber
aus Hüttental-Weidenau

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am 06. 04. 2004.

Erstgutachter:	PD Dr. Gero Steinberg
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 04. 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2002 bis Dezember 2003 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Gero Steinberg durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Weber, I.; Gruber, C. und Steinberg, G. (2003). A class V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. Plant Cell 15 (12), 2826-2842.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Bedeutung von Myo5 für das polare Wachstum, die pathogene Entwicklung und den Transport polarer Chitinsynthasen in *Ustilago maydis*“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Isabella Weber

ÜBERALL GEHT EIN FRÜHES AHNEN DEM SPÄTEREN WISSEN VORAUS.

Alexander von Humboldt (1769-1859)

Zusammenfassung

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Die Bildung des infektiösen dikaryotischen Filaments setzt die Fusion zweier kompatibler Sporidien voraus, die stimuliert durch das Pheromon des Partners Konjugationshyphen ausbilden, aufeinander zu wachsen und miteinander fusionieren. Sowohl für den Kreuzungsprozess als auch für die erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze ist die Fähigkeit des Pilzes, polar zu wachsen, von essentieller Bedeutung. Polares Wachstum erfordert die gerichtete Anlieferung von Wachstums- und Zellwandkomponenten entlang des Cytoskeletts zur Wachstumsspitze hin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Klasse V Myosin, Myo5, für verschiedene Stadien des Pilzes während seines sexuellen Lebenszyklus von enormer Bedeutung ist. Myo5 ist essentiell für die erfolgreiche Perzeption des Pheromons und die Ausbildung von Konjugationshyphen. Auch das Wachstum dikaryotischer Hyphen ist in *myo5^{ts}*-Mutanten gestört. Zudem zeigten *myo5^{ts}*-Infektionshyphen deutliche Störungen des polaren Wachstums während der frühen Infektionsphase, was sich in der Ausbildung geschwollene Hyphenverzweigungen äußerte, und sie induzierten bereits bei permissiver Temperatur nur bei 2,7% der Pflanzen Tumore. Aufgrund der aus Vorversuchen resultierenden Erkenntnisse wurden Chitinsynthasen als mögliche „Cargos“ von Myo5 in Betracht gezogen und näher untersucht. Das Genom von *U. maydis* kodiert für sieben Chitinsynthasen (Chs1-7) und eine Myosin-Chitinsynthase (Mcs1). Sowohl die Phänotypen der Chitinsynthase-Deletionsstämme wurden näher analysiert, als auch *in vivo* Lokalisationsstudien der Chitinsynthasen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Δ *chs5*- und auch Δ *chs7*-Zellen ähnliche Zelltrennungsdefekte wie Δ *myo5*-Zellen sowie Störungen in der Ausbildung von Konjugationshyphen aufwiesen. Zudem führte die Deletion von *chs7* zu einer starken Beeinträchtigung der Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Medium und der Pathogenität. Die Deletion von *chs6* und *mcs1* störte die Filamentbildung kompatibler Stämme nicht, resultierte allerdings in einer völligen Apathogenität. Ähnlich wie Myo5 lokalisierten die vier Chitinsynthasen Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 in der Spitze wachsender Sporidien. Inhibitorversuche ergaben, dass die Lokalisation dieser polaren Chitinsynthasen von Aktin abhängt. Untersuchungen zur Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 in *myo5^{ts}*-Mutanten zeigten eine deutliche Fehlverteilung von Chs7 in *myo5^{ts}*-Mutanten nach einstündiger Inkubation bei restriktiver Temperatur. Durch den neu etabliertem *in vivo* Aktinmarker Fim1GFP konnte eine Störung des Aktin-Cytoskeletts als Ursache ausgeschlossen werden. Sowohl die phänotypischen Analysen als auch die Lokalisations- und Inhibitorstudien weisen deutlich auf eine Beteiligung von Myo5 an der Lokalisation von Chs7 hin.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Aa	Aminosäuren
α	bei Antikörpern: anti-
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione-Monoxime
ble ^R	Phleomycin-Resistenzkassette
bp	Basenpaar(e)
Chs1 (<i>chs1</i>)	Chitinsynthase 1 aus <i>U. maydis</i>
Chs2 (<i>chs2</i>)	Chitinsynthase 2 aus <i>U. maydis</i>
Chs3 (<i>chs3</i>)	Chitinsynthase 3 aus <i>U. maydis</i>
Chs4 (<i>chs4</i>)	Chitinsynthase 4 aus <i>U. maydis</i>
Chs5 (<i>chs5</i>)	Chitinsynthase 5 aus <i>U. maydis</i>
Chs6 (<i>chs6</i>)	Chitinsynthase 6 aus <i>U. maydis</i>
Chs7 (<i>chs7</i>)	Chitinsynthase 7 aus <i>U. maydis</i>
cbx-Lokus	Genort der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinatdehydrogenase aus <i>U. maydis</i>
cbx ^R	Carboxin-Resistenzkassette
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CM	Komplettmedium
cpm	„counts per minute“
C-terminal	carboxy-terminal
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIC	„Differential Interference Contrast“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
dpi	Tag(e) nach Infektion
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“ = verstärktes GFP
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hyg ^R	Hygromycin-Resistenzkassette
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Lat A	Latrunculin A (Aktin-Inhibitor)
Mcs1 (<i>mcs1</i>)	Myosin-Chitinsynthase 1 aus <i>U. maydis</i>

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
min	Minute
Mfa	„mating factor a“
ml	Milliliter
Myo5 (<i>myo5</i>)	Klasse V Myosin aus <i>U. maydis</i>
nat ^R	Nourseothricin-Resistenzkassette
nt	Nukleotide
N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
otef-Promotor	Promotor des Translations-Elongationsfaktors 1 aus <i>U. maydis</i> , durch 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen 8-fach verstärkt
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-(2-ethansulfonat)
s	Sekunde
ScChs2	Chitinsynthase 2 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat + Na ₂ EDTA
TBE	Tris-Borat + Na ₂ EDTA
TE	Tris-HCl + Na ₂ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	„Unit“ = Enzymeinheit
UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence“
µl	Microliter
µm	Micrometer
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
WGA	„wheat germ agglutinin“ (Weizenkeim-Agglutinin)

Sowie Aminosäuren im Einbuchstaben-Code

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Polares Wachstum.....	1
1.2 Das Cytoskelett.....	2
1.3 Die Bedeutung von Chitinsynthasen für die pilzliche Zellwand.....	5
1.4 <i>Ustilago maydis</i> , der Erreger des Maisbeulenbrandes	6
1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	8
2 ERGEBNISSE.....	9
2.1 Myo5, ein putativer Organellentransporter	9
2.1.1 Myo5 ist ein Klasse V Myosin	9
2.1.2 Myo5 ist essentiell für die Ausbildung von Konjugationshyphen	11
2.1.3 GFPMyo5-Lokalisation in der Hyphe ist unabhängig von Kin2	16
2.1.4 <i>myo5^{ts}</i> -Mutanten zeigen reduzierte Filamentbildung	17
2.1.5 Myo5 ist wichtig für die Morphogenese dikaryotischer Hyphen.....	18
2.1.6 <i>myo5^{ts}</i> -Stämme sind in der Pathogenität reduziert.....	20
2.1.7 <i>myo5^{ts}</i> -Stämme haben Defekte in der frühen Infektionsphase.....	22
2.2 Sind Chitinsynthasen ein „Cargo“ von Myo5?	24
2.2.1 <i>myo5^{ts}</i> -Zellen sind hypersensitiv gegenüber Nikkomycin Z.....	24
2.2.2 Sequenzanalysen der <i>U. maydis</i> Chitinsynthasen	25
2.2.3 Deletion der Chitinsynthasen und der Myosin-Chitinsynthase	30
2.2.3.1 $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ -, $\Delta chs5$ -, $\Delta chs6$ -, $\Delta chs7$ - und $\Delta mcs1$ -Sporidien	31
2.2.3.2 $\Delta chs5$ - und $\Delta chs7$ -Zellen zeigen eine gestörte Chitinverteilung	33

2.2.3.3	<i>Komplementation der FB2Δchs5 und FB2Δchs7 Phänotypen</i>	35
2.2.3.4	<i>Konjugationshyphen- und Filamentbildung der Deletionsstämme</i>	37
2.2.3.5	<i>Deletion von chs6, chs7 und mcs1 führt zu Pathogenitätsverlust</i>	41
2.2.3.6	<i>Einige Chitinsynthase-Mutanten zeigen Nikkomycin Z-Hypersensitivität</i>	44
2.2.4	<i>in vivo Lokalisation der Chitinsynthase-Fusionsproteine</i>	46
2.2.4.1	<i>Lokalisation der Chitinsynthasen in Sporidien, Konjugationshyphen und Filamenten</i>	46
2.2.4.2	<i>Abhängigkeit der Lokalisation polarer Chitinsynthasen vom Cytoskelett</i>	52
2.2.5	<i>Ist Myo5 an der Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 beteiligt?</i>	54
2.2.5.1	<i>in vivo Aktin-Lokalisation durch ein Fimbrin-GFP-Fusionsprotein</i>	54
2.2.5.2	<i>Lokalisation der polaren Chitinsynthasen in myo5^{ts}-Mutanten</i>	58
2.2.6	<i>Was ist die Ursache der Repolarisierung von Chs7YFP in Myo5^{ts}?</i>	60
2.2.6.1	<i>GFPMyo5^{ts} befindet sich nach 3 h bei 28°C polar in der Knospe</i>	60
2.2.6.2	<i>Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} ist aktinabhängig</i>	61
3	DISKUSSION	63
3.1	Die Bedeutung von Myo5 für die pathogene Entwicklung	63
3.1.1	<i>myo5^{ts}-Mutanten haben Defekte in der Pheromonperzeption und Konjugationshyphenbildung</i>	64
3.1.2	<i>Die Morphologie dikaryotischer Hyphen ist abhängig von Myo5</i>	65
3.1.3	<i>Myo5 ist essentiell für die Pathogenität von Ustilago maydis</i>	66
3.2	Chitinsynthasen als potentielles „Cargo“ von Myo5	68
3.2.1	<i>Sieben Chitinsynthasen und eine Myosin-Chitinsynthase</i>	69
3.2.2	<i>Deletion einzelner Chitinsynthasen führt zu phänotypischen Veränderungen</i>	70
3.2.3	<i>Nikkomycin Z-Hypersensitivität einiger Deletionsstämme deutet polare Chitinsynthase-Lokalisation an</i>	72
3.2.4	<i>Lokalisation der polaren Chitinsynthasen ist aktinabhängig</i>	73
3.2.5	<i>Eine Temperaturerhöhung auf 28°C beeinträchtigt das Aktin-Cytoskelett nicht</i>	75

3.2.6	Chs7-Lokalisation ist in <i>myo5^{ts}</i> -Mutanten gestört	76
3.2.7	Aktinabhängige GFPMyo5 ^{ts} -Repolarisierung nach Temperaturerhöhung	79
3.2.8	Chs7-Fehlverteilung kann nicht alleinige Ursache der Morphologie-Defekte von <i>myo5^{ts}</i> -Mutanten sein	81
3.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	82
4	MATERIALIEN UND METHODEN	83
4.1	Material und Bezugsquellen	83
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	83
4.1.2	Oligonukleotide.....	83
4.1.3	Stämme	87
4.1.4	Ausgangsplasmide und Genbanken	89
4.1.5	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	90
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	96
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	96
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	97
4.2.3	Fixierung und Anfärbung von Zellen	100
4.2.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung	101
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	102
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	102
4.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	103
4.3.3	In vitro Modifikationen von Nukleinsäuren	103
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	105
4.3.5	Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden	106
4.3.6	TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten.....	107
4.3.7	Nachweis von Nukleinsäuren.....	107
4.3.8	Sequenz- und Strukturanalyse.....	109
4.4	Biochemische Methoden	110
4.4.1	Isolierung von Proteinen	110
4.4.2	Auftrennung und Nachweis von Proteinen.....	111
5	LITERATURVERZEICHNIS	113

1 Einleitung

1.1 Polares Wachstum

Polares und gerichtetes Wachstum ist ein charakteristisches Merkmal vieler Zellen. Pflanzenzellen wachsen vorwiegend durch diffuse oder interkalare Ausdehnung ihrer Zellwände, jedoch ebenso durch polare Wachstumsprozesse z. B. in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren (Schnepf, 1986; Sietsma und Wessel, 1994). In Pilzen ist polares Wachstum vorherrschend und entscheidend für die Fähigkeit der Pilze, feste Substrate, wie z. B. Holz und Keratin, zu durchwachsen oder sogar in lebende Organismen einzudringen (Sietsma et al., 1995). Pilzliches Spitzenwachstum wird zur Zeit durch ein Modell beschrieben (Abb. 1), dass sowohl die Biogenese der Zellwand als auch die Anlieferung von Wachstumskomponenten im Apex berücksichtigt (Wessels, 1986, 1988; Bartnicki-Garcia, 1999; Bartnicki-Garcia et al., 2000)

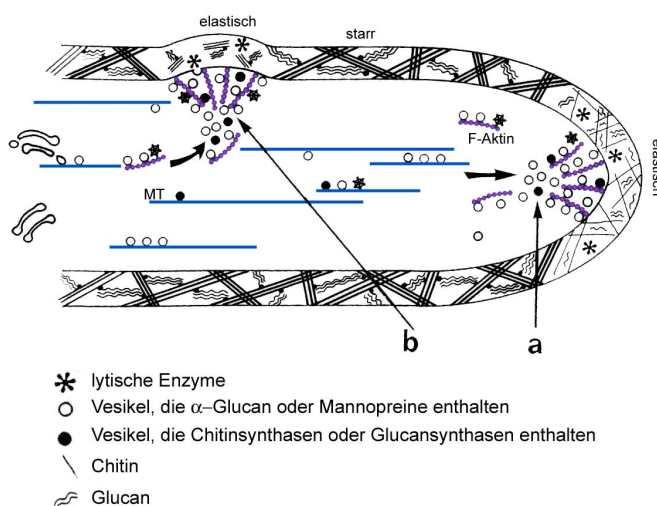


Abb. 1: Modell der Zellwandbiogenese während des apikalen Hyphenwachstums (a) und der Hyphenverzweigung (b).

Zellwandsubstrate und Enzyme akkumulieren in der elastischen Hyphenspitze. Details siehe Text. (Abbildung modifiziert nach Goody, 1994).

Die polare Synthese von Zellwandkomponenten und die Ausdehnbarkeit der Zellwand sind Grundlage des hyphalen Wachstums (Sietsma und Wessel, 1994). Als treibende Kraft der Zellwandexpansion scheint der Turgordruck von Bedeutung zu sein (Bartnicki-Garcia et al., 2000). Durch die polare Ablagerung des Zellwandmaterials bleibt nach dem „steady-state“-Modell die Zellwand der Hyphenspitze elastisch, während basale Zellregionen über

eine höhere Zellwandfestigkeit verfügen (Wessels, 1990). Die Elastizität der Hyphenspitze kann durch die noch nicht stattgefundene Kristallisierung von Chitin und Vernetzung von Chitin und β -Glucan (Vermeulen und Wessels, 1986) bedingt sein. Die Frequenz der Vesikelanlieferung zur Wachstumsregion und die Verteilung der apikalen Vesikel wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Plastizität der Hyphenspitze diskutiert (Bartnicki-Garcia, 1999; Bartnicki-Garcia et al., 2000) und durch das Modell des „vesicle supply centers“ (VSC) erklärt. Nach diesem Modell fungiert der Spitzenkörper als „vesicle supply center“ (VSC), an dem Vesikel akkumulieren und in alle Richtungen verteilt werden (Bartnicki-Garcia, 1999; Bartnicki-Garcia et al., 2000). Während des Hyphenwachstums entsteht so durch das VSC ein Exocytosegradient, der die Form der Hyphe determiniert. Die Bedeutung des Spitzenkörpers für das polare Wachstum wird durch Versuche unterstrichen, die gezeigt haben, dass durch Manipulation der Spitzenkörperposition Verzweigungen und Richtungsänderungen des Wachstums induziert werden können (Bartnicki-Garcia et al., 1995; Bartnicki-Garcia, 1999). Grundlage dieser apikalen Vesikelakkumulation ist eine polare Vesikelanlieferung, die entlang des Cytoskeletts erfolgen kann.

1.2 Das Cytoskelett

Die Morphogenese der Hyphe ist eng mit dem Cytoskelett und dem aktiven Transport durch molekulare Motoren verknüpft. Molekulare Motoren sind Motorproteine, die in der Lage sind, die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie in mechanische Energie umzuwandeln. Gebunden an Organellen oder Vesikel sind sie für deren gerichteten Transport entlang von Mikrotubuli und F-Aktin von zentraler Bedeutung (Steinberg, 2000). Es werden mikrotubuliabhängige Kinesine und Dynein sowie F-Aktin-assoziierte Myosine unterschieden (Abb. 2).

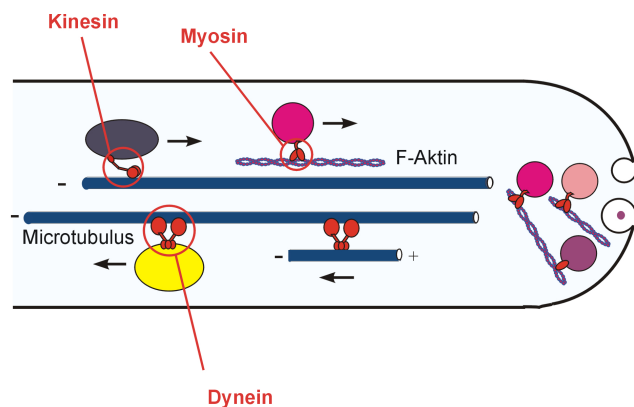


Abb. 2: Modellhafte Darstellung des Cytoskeletts und des Organellentransports durch molekulare Motoren.

Myosine bewegen sich entlang von F-Aktin, während Kinesine und Dynein sich zu den Plus-Enden bzw. Minus-Enden der Mikrotubuli bewegen. (Abbildung modifiziert nach Steinberg, 2000).

Für die Hyphenmorphogenese verschiedener Pilze scheinen sowohl Mikrotubuli als auch Aktin wichtig zu sein (Akashi et al., 1994; Heath, 1995; Torralba et al., 1998; Heath et al., 2000). Zudem liegen Hinweise über den Einfluss der mikrotubuliabhängigen Motoren Kinesine und Dynein für das Hyphenwachstum vor (Lehmler et al., 1997; Seiler et al., 1997; Riquelme et al., 2000). So führte z. B. die Deletion des konventionellen Kinesins, Kin2, in *U. maydis* zu drastischen Störungen des Hyphenwachstums und könnte die Ursache der reduzierten Virulenz des Pilzes sein (Lehmler et al., 1997). Über die Funktionen der aktinabhängigen Myosin-Motoren im pilzlichen Hyphenwachstum ist bislang wenig bekannt. In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* üben Klasse I Myosine Funktionen in der Endocytose (Geli und Riezman, 1998) und Aktinorganisation (Goodson et al., 1996; Lee et al., 2000; Toya et al., 2001) sowie Klasse II Myosine Funktionen in der Cytokinese aus (Bezanilla et al., 2000; Tolliday et al., 2003). Für die Klasse V Myosine aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* ist eine Beteiligung am Transport sekretorischer Vesikel (Johnston et al., 1991; Govindan et al., 1995; Schott et al., 1999; Motegi et al., 2001; Win et al., 2001) bekannt. Klasse V Myosine aus *S. cerevisiae* übernehmen zudem Funktionen im Organellentransport (Hill et al., 1996; Catlett et al., 2000; Rossanese et al., 2001; Estrada et al., 2003), im mRNA-Transport (Jansen et al., 1996; Long et al., 1997) sowie bei der Orientierung der mitotischen Spindel (Yin et al., 2000; Hwang et al., 2003). Hinweise über einen möglichen Einfluss von Myosinen für das Hyphenwachstum filamentöser Pilze existieren bislang nur aus *Aspergillus nidulans* und *Candida albicans*. In *A. nidulans* übernimmt das Klasse I Myosin MyoA wichtige Funktionen während des polaren Wachstums und ist für die Zellpolarität von Bedeutung (McGoldrick et al., 1995; Oshero et al., 1998). In *C. albicans* ist das Klasse I Myosin Myo5p für die Hyphenbildung erforderlich (Oberholzer et al., 2002). Zur Funktion eines Klasse V Myosins im Hyphenwachstum liegt derzeit erst eine Untersuchung vor. Darin konnte gezeigt werden, dass das Klasse V Myosin, Myo2p, für die Hyphenbildung in *C. albicans* essentiell ist (Woo et al., 2003). Es ist daher anzunehmen, dass Klasse V Myosine in anderen filamentös wachsenden Pilzen ebenso von großer Wichtigkeit sind. Zudem ist es durch die Kenntnisse über Klasse V Myosine aus den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* denkbar, dass diesen Motorproteinen in Hyphen eine Bedeutung im Vesikel- und Organellen-Transport zukommt.

Frühere Untersuchungen, durchgeführt von C. Gruber und G. Steinberg, lieferten erste Hinweise auf eine mögliche Funktion des Klasse V Myosins, Myo5, in *U. maydis*. Die Deletion von *myo5* resultierte in langsam wachsenden Zellen, die deutlich dicker als

vergleichbare Wildtypzellen waren. $\Delta myo5$ -Zellen waren in der Zelltrennung gestört (Abb. 3, A2), was zur Bildung großer Zellaggregate führte (Weber et al., 2003). Dies legt eine Funktion von Myo5 in der Morphogenese und Zelltrennung haploider Sporidien nahe. Dieser Schluss wird durch die *in vivo* Lokalisation eines funktionellen GFPMyo5-Fusionsproteins bestätigt, da dieses Fusionsprotein in knospenden Zellen an der Wachstumsstelle und an Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle akkumulierte (Abb. 3, B1 und B2). Eine Aussage über die von Myo5 transportierte Last („Cargo“) konnte anhand der bislang existierenden Daten nicht eindeutig getroffen werden. Weitere Vorversuche mit einem kreuzreaktiven Antikörper gegen Chs2p aus *S. cerevisiae* zeigten eine Chitinsynthase-Fehlverteilung in *myo5^{ts}*-Zellen bei restriktiver Temperatur (G. Steinberg, unveröffentlicht). Da in *S. cerevisiae* das Klasse V Myosin Myo2p an dem Transport einer Chitinsynthase beteiligt ist (Santos und Snyder, 1997), lag die Vermutung nahe, dass auch Myo5 in *U. maydis* an dem Chitinsynthase-Transport beteiligt sein könnte.

Die Deletion von *myo5* in haploiden Sporidien von *U. maydis* hat gravierende Defekte zur Folge. Welche Bedeutung Myo5 für die komplexeren hyphalen Wachstumsstadien während der pathogenen Entwicklung zukommt, war zu Beginn dieser Arbeit unklar.

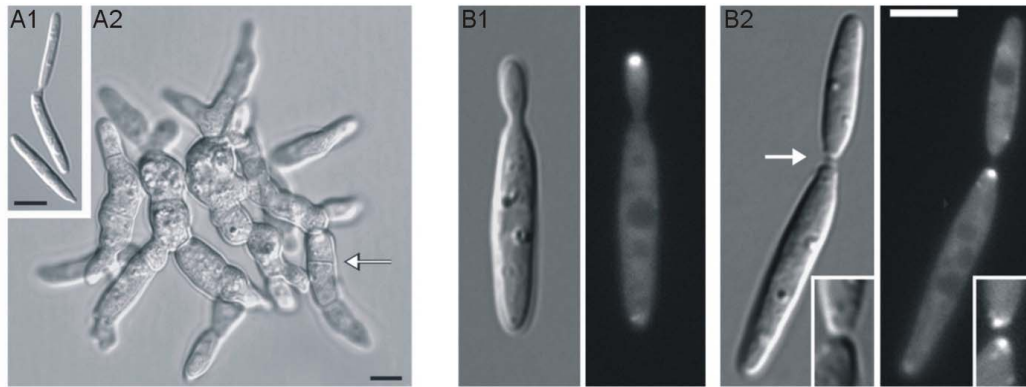


Abb. 3: $\Delta myo5$ -Zellen und GFPMyo5-Lokalisation.

A: Deletion von *myo5* führt im Vergleich zu Wildtypzellen (A1) zu einer Verdickung der Zellen und zur Bildung von Zellaggregaten (A2). Balken = 5 μ m.

B: Knospende Zellen weisen ein fokussiertes GFPMyo5-Signal in der Spitze auf (B1). GFPMyo5 lokalisiert auch im Trennungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle (B2). Balken = 5 μ m. Entnommen aus Weber et al., 2003.

1.3 Die Bedeutung von Chitinsynthasen für die pilzliche Zellwand

Chitin ist der wichtigste festigkeitsvermittelnde integrale Bestandteil der Zellwände von Echten Pilzen und von Flagellatenpilzen (Chytridiomycetes) und daher von zentraler Bedeutung für deren Integrität (Gooday, 1994). Chitin konnte auch in Invertebraten, insbesondere Arthropoden, jedoch nicht in Pflanzen und Vertebraten gefunden werden (Cohen, 2001). Aufgrund dieses taxonomisch begrenzten Vorkommens von Chitin, stellt die Chitinsynthese ein sicheres und selektives Target für Fungizide und Insektizide dar (Cohen, 2001). Die Synthese des Chitins erfolgt durch membrangebundene Glycosyltransferasen, die sog. Chitinsynthasen, die den Transfer von N-Acetylglucosamin vom Substrat UDP-N-Acetylglucosamin auf eine wachsende Kette von β -1,4 verknüpften N-Acetylglucosamin-Einheiten katalysieren (Cabib et al., 1996). Der N-Terminus der Chitinsynthasen ist nicht konserviert und variiert z. B. stark zwischen Chs1p und Chs2p von *S. cerevisiae*, weshalb angenommen wurde, dass er für die Lokalisation und Regulation von Bedeutung ist (Valdivieso et al., 1999). Die Deletion dieser nicht homologen Bereiche hatte jedoch nur geringe Effekte auf die enzymatische Aktivität zur Folge, während kleine Deletionen innerhalb des hoch konservierten C-terminalen Bereichs die Enzymaktivität schädigten (Ford et al., 1996; Uchida et al., 1996). Daher scheint dieser in Chs1p und Chs2p konservierte Bereich alle notwendigen Informationen für die Enzymaktivität zu enthalten. Es zeigte sich, dass besonders die in fast allen Chitinsynthasen vorkommenden Sequenzbereiche EDR und QRRRW essentiell für die Aktivität von Chs2p sind (Nagahashi et al., 1995; Ford et al., 1996; Cos et al., 1998).

Durch elektronenmikroskopische Studien und Zellaufreinigungen konnten cytoplasmatische Microvesikel, die sog. Chitosomen, identifiziert werden (Bracker et al., 1976; Flores Martinez und Schwencke, 1988; Sietsma et al., 1996). Diese spezialisierten Vesikel, die im ER und Golgi-Apparat entstanden sind, enthalten 80% der in Zellen vorhandenen Chitinsynthasen (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1999). Sie akkumulieren besonders in Hyphenspitzen (Sietsma et al., 1996) und dienen vermutlich dem Chitinsynthase-Transport (Kamada et al., 1991; Ruiz-Herrera und San-Blas, 2003). Defekte in der Anlieferung von Chitinsynthasen könnten die Synthese von Chitin in der pilzlichen Zellwand beeinträchtigen und somit zu morphologischen Veränderungen führen, wie sie z. B. in *Δmyo5*-Zellen auftreten. Zusammengefasst ist es somit denkbar, dass Myo5 am Chitosomen-Transport in *U. maydis* beteiligt ist.

1.4 *Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes

Der Erreger des Maisbeulenbrands *Ustilago maydis* hat sich in den letzten Jahrzehnten als Modellorganismus für phytopathogene Pilze (Banuett, 1995; Kahmann et al., 1999; Bölker, 2001; Martinez-Espinoza et al., 2002) und für Untersuchungen des Cytoskeletts etabliert (Wedlich-Soldner et al., 2000; Steinberg et al., 2001; Straube et al., 2001; Banuett und Herskowitz, 2002; Wedlich-Soldner et al., 2002b; Wedlich-Soldner et al., 2002a; Straube et al., 2003). Junge Tumore von *U. maydis* sind in mittel- und südamerikanischen Staaten als Nahrungsmittel bekannt und gelten in Nordamerika sogar als Delikatesse (Banuett, 1992; Valverde et al., 1995; Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998). Aber auch als homöopathisches Mittel z. B. zur Behandlung von Haarausfall und Hautausschlägen findet *U. maydis* Verwendung (u. a. <http://www.abchomeopathy.com/r.php/Ust>).

Während seines Lebenszyklus durchläuft *Ustilago maydis* drei unterschiedliche Kernphasen, die eng mit unterschiedlichen morphologischen Stadien des Pilzes verknüpft sind (Abb. 4). Die saprophytischen haploiden Basidiosporen (auch Sporidien genannt) vermehren sich hefeartig durch Knospung (Abb. 4). Sie sind unter Laborbedingungen leicht in Flüssig- und auf Festmedium kultivierbar. Die pathogene Entwicklung des Pilzes beginnt, wenn sich Sporidien auf der Pflanzenoberfläche erkennen, die sich in ihren Paarungsloci unterscheiden. Der *a*-Lokus kodiert für ein Pheromon und Pheromonrezeptor und ist somit für die Zell-Zellerkennung von elementarer Bedeutung (Bölker et al., 1992). Als Reaktion auf das Pheromon des Partners wird ein Zellzyklusarrest in G2 initiiert (Garcia-Muse et al., 2003), und die Zellen bilden polar wachsende Konjugationshyphen aus (Spellig et al., 1994). Diese Konjugationshyphen wachsen entlang eines Pheromongradienten aufeinander zu, fusionieren an ihren Spitzen und bilden eine dikaryotische Hyphe aus (Snetselaar et al., 1996). Ein stabiles Dikaryon wird nur ausgebildet, wenn beide Kerne unterschiedliche Allele des multiallelischen *b*-Lokus tragen und somit für unterschiedliche bE und bW Homeodomänen-Proteine kodieren (Gillissen et al., 1992; Kämper et al., 1995). Im distalen Bereich der dikaryotisch wachsenden Spitzenzelle werden in regelmäßigen Abständen Septen gebildet, welche die charakteristischen leeren Abschnitte am Hyphenende zur Folge haben (Christensen, 1963; Steinberg et al., 1998).

Sowohl die Ausbildung der Konjugationshyphen als auch die Bildung dikaryotischer Hyphen kann auch unter Laborbedingungen erfolgen. Während Ersteres u. a. durch Stimulation mit synthetischem Pheromon erfolgen kann, bilden kompatible Stämme auf

aktivkohlehaltigem Medium dikaryotische Filamente aus. Diese sind als weißes, pelzartiges Mycel sichtbar (sog. Fuz⁺ Phänotyp) (Banuett und Herskowitz, 1994), während Sporidien gräuliche Kolonien ausbilden (Puhalla, 1968).

Die weiteren Entwicklungsprozesse der dikaryotischen Hyphe sind abhängig von der Wirtspflanze. An geeigneter Stelle kommt es zur Ausbildung einer Appressorien-ähnlichen Struktur (Snetselaar und Mims, 1992), über die der Pilz in die Pflanze eindringt. Der genaue Mechanismus des Eindringens ist zur Zeit noch wenig verstanden. In der Pflanze wächst der Pilz zunächst intrazellulär, wobei die Plasmamembran der Pflanzenzelle intakt bleibt (Snetselaar und Mims, 1992). Einige Tage nach der Infektion kommt es in der Nähe der Infektionsstelle neben Nekrosen zur Ausbildung von Anthocyan, was als Indiz für das erfolgreiche Eindringen des Pilzes gilt (Banuett und Herskowitz, 1996).

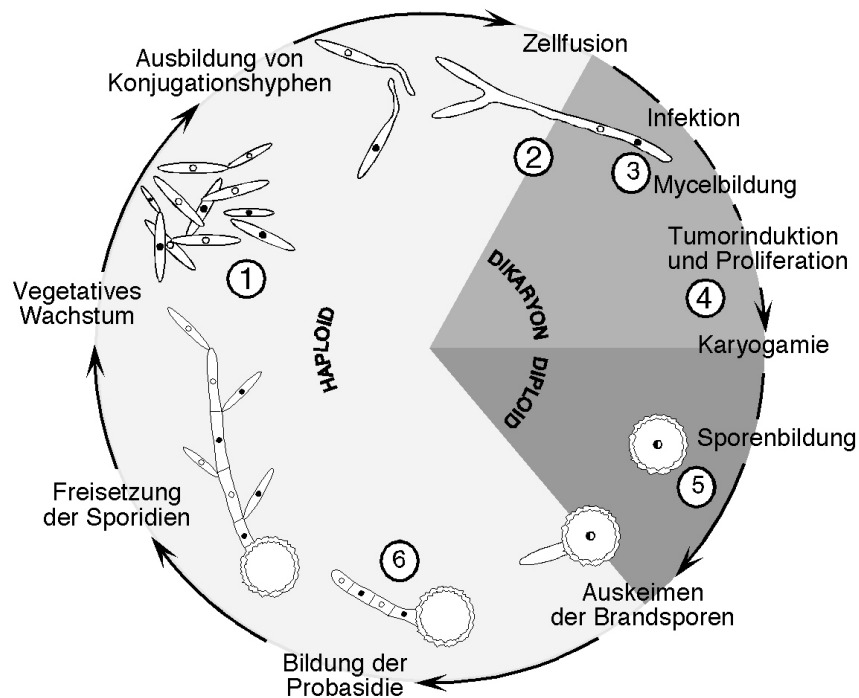


Abb. 4: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.

Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung (1). Nach Fusion zweier haploider Zellen wird ein Dikaryon ausgebildet (2), das über eine Appressorien-ähnlichen Struktur die Pflanze penetriert (3). Im Tumor (Galle) erfolgt eine starke Proliferation des Pilzmycels (4) sowie die Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen (5). Unter der Ausbildung des Promycels findet die Keimung einer Teliospore statt (6). Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Müller.

Innerhalb der Pflanze wächst der Pilz als verzweigtes, septiertes Mycel (Snetselaar und Mims, 1992; Banuett und Herskowitz, 1996). Bereits fünf bis sechs Tage nach der Infektion können erste Tumore (Gallen) detektiert werden. Diese Tumore bestehen aus unzähligen vergrößerten Pflanzenzellen, in denen der Pilz nun auch interzellulär wächst. Im weiteren Verlauf der pathogenen Entwicklung kommt es zu einer starken Proliferation der pilzlichen Filamente. Diese Filamente runden sich ca. neun bis zehn Tage nach der Infektion ab (sporogene Hyphen). Die erfolgte Kernfusion resultiert in diploiden Teliosporen, die zur schwarzen Färbung der späten Tumore führen (Abb. 4). Während der Keimung der Teliosporen findet die Meiose statt, und eine Probasidie wird ausgebildet, von der sich seitlich haploide Basidiosporen abschnüren (Abb. 4).

Der schnelle sexuelle Lebenszyklus, die auch unter Laborbedingungen stattfindende Sporenkeimung und Meiose, die einfache axenische Kultivierbarkeit und kurze Generationszeit sowie die Tatsache, dass *U. maydis* während seiner vegetativen Phase als haploide Zelle vorliegt, erleichtern das genetische und zellbiologische Arbeiten. Verschiedenste molekularbiologische Methoden sind gut etabliert (Basse und Steinberg, 2004). Daher bietet *U. maydis* sehr gute Möglichkeiten für die Funktionsanalyse eines Klasse V Myosins im polaren Wachstum und in der Pathogenität.

1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die Rolle von Myo5 für die Morphogenese und Cytokinese haploider Sporidien war bereits in vorangegangenen Versuchen von G. Steinberg und C. Gruber näher untersucht worden (Gruber, 1998). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung von Myo5 für weitere Entwicklungsprozesse und die Pathogenität von *U. maydis* zu beleuchten. Dabei sollte vor allem geklärt werden, welchen Einfluss Myo5 auf den Kreuzungsprozess, die Filamentbildung, das polare Wachstum dikaryotischer Hyphen und die Proliferation in der Maispflanze hat. Da von *S. cerevisiae* eine von dem Klasse V Myosin Myo2p-abhängige Lokalisation der Chitinsynthase Chs3p bekannt war (Santos und Snyder, 1997) und von *U. maydis* bereits Anzeichen über eine mögliche Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen existierten (G. Steinberg, pers. Mitteilung), wurde der Aufklärung der „Cargofrage“ eingehend nachgegangen. Dies beinhaltete sowohl phänotypische Analysen der Chitinsynthase-Deletionsstämme als auch Chitinsynthase-Lokalisationsstudien in *myo5^{ts}*-Mutanten.

2 Ergebnisse

2.1 Myo5, ein putativer Organellentransporter

2.1.1 Myo5 ist ein Klasse V Myosin

Basierend auf Sequenzhomologien in der Motordomäne werden 17 Myosin-Klassen unterschieden, von denen nur die Klassen I, II und V in allen Pilzen vorhanden sind (Abb. 5).

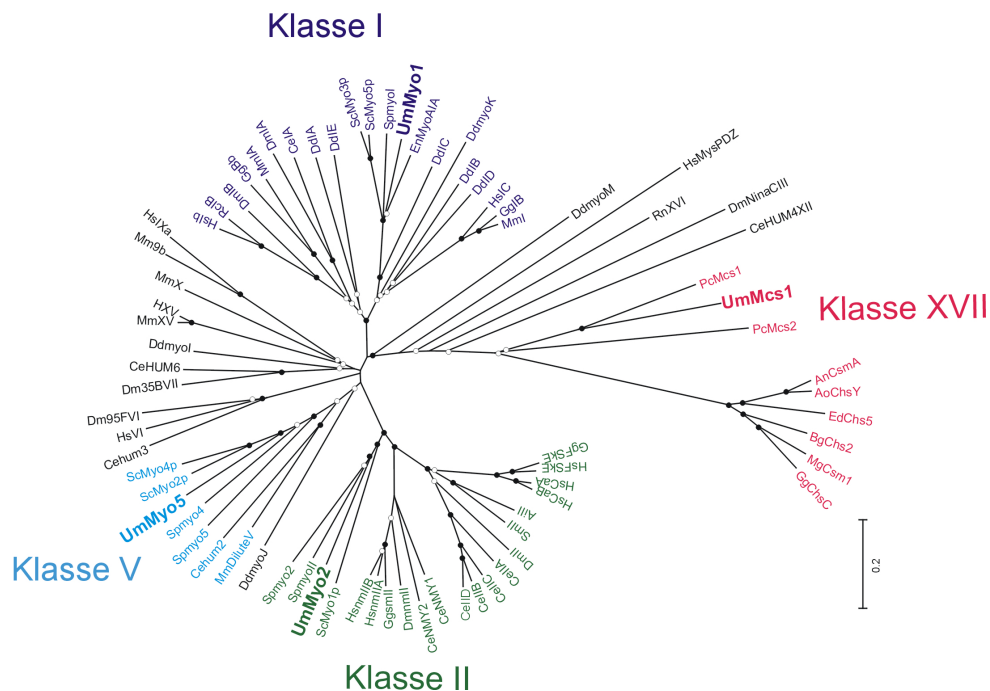


Abb. 5: Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter Myosin-Motordomänen.

Myo5 aus *U. maydis* ist am nächsten verwandt zu Myo2p aus *S. cerevisiae*. Alle Myosin-Motorsequenzen sind der Myosin-Homepage (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>) entnommen, mit Ausnahme von AnCsmA (Accession-Number: AB000125), AoChsY (Accession-Number: AB081656), EdChs5 (Accession-Number: AF469116), BgChs2 (Accession-Number: AF189366), MgCsm1 (Accession-Number: AB018251), GgChsC (Accession-Number: AY052547), sowie PcMcs1 und PcMcs2 (http://www.jgi.doe.gov/programs/whiterot/whiterot_mainpage.html), die entsprechend verkürzt wurden. Bootstrapwerte: geschlossener Kreis ≥ 90 , offener Kreis ≥ 50 . Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure (vgl. Materialien und Methoden).

Das Genom von *U. maydis* enthält einen Vertreter aus jeder Klasse, während z. B. *Saccharomyces cerevisiae* jeweils zwei den Klassen I und V zugeordnete Myosine (Johnston et al., 1991; Haarer et al., 1994; Goodson und Spudich, 1995; Goodson et al., 1996) sowie ein Klasse II Myosin (Watts et al., 1987) besitzt. Nur in filamentösen Pilzen konnten bislang Myosin-Chitinsynthasen gefunden werden (Fujiwara et al., 1997; Park et al., 1999; Zhang und Gurr, 2000; Chigira et al., 2002; Amnuaykanjanasin und Epstein, 2003; Madrid et al., 2003), die in die separate Klasse XVII eingeordnet werden.

Zwei Myosine, Myo1 und Myo5, sind in Vorarbeiten bereits identifiziert worden (Gruber, 1998). In Zusammenarbeit mit Dr. G. Gupta wurden Analysen der Domänenstruktur durchgeführt, woraus sich ergab, dass Myo5 alle für Klasse V Myosine typischen Domänen enthält (Abb. 6). Die N-terminale Motordomäne ist hoch konserviert, trägt ein konserviertes ATP-bindendes Sequenzmotiv, den sog. „P-loop“ (Saraste et al., 1990), und zeigt 47-64% Identität zu anderen Klasse V Myosinen aus Hefe und Vertebraten. Höchste Sequenzidentität hat Myo5 zu Myo2p aus *S. cerevisiae* (34% Identität über das ganze Protein). In der Halsregion von Myo5 befinden sich sechs IQ-Motive (E-values: 6,7 e-4 bis 7,6 e-05, Pfam, siehe Materialien und Methoden). Für Myo2p aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass diese IQ-Motive für die Bindung leichter Ketten und Calmodulin verantwortlich sind (Shannon und Li, 2000). Zudem finden sich im C-Terminus der Myo5-Sequenz konservierte Aminosäuren, für die für Myo2p gezeigt wurde, dass sie in Zusammenhang mit sekretorischen und vakuolären Funktionen stehen (Catlett und Weisman, 1998; Schott et al., 1999). Außerdem enthält Myo5 eine konservierte AF-6/cno Homologiedomäne von Aminosäure 1440 bis 1543 (E-value: 4 e-40, Pfam, siehe Materialien und Methoden). Diese ist an der Interaktion eines Klasse V Myosins mit einem konventionellen Kinesin beteiligt (Huang et al., 1999). An Position 1405 befindet sich ein konserviertes Serin, das in *Xenopus* die Freisetzung des „Cargos“ durch calciumabhängige Phosphorylierung vermittelt (Karcher et al., 2001).

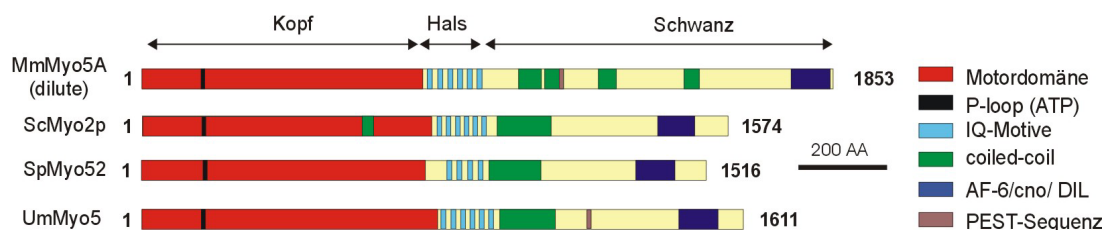


Abb. 6: Domänenstrukturen von UmMyo5, Myo5A aus Maus, Myo2p aus *S. cerevisiae* und Myo52 aus *S. pombe*.

Alle für Klasse V Myosine typischen Domänen werden auch für Myo5 vorhergesagt. Höchste Identität hat Myo5 zu Myo2p von *S. cerevisiae*.

Wie in Myo5A aus Maus findet sich auch in der Sequenz von Myo5 von Aminosäure 1198 bis 1215 eine potentielle PEST-Sequenz (PESTfind, siehe Materialien und Methoden), die an der durch Calcium regulierten Proteolyse beteiligt sein kann (Rechsteiner, 1990).

2.1.2 Myo5 ist essentiell für die Ausbildung von Konjugationshyphen

Für *Ustilago maydis* ist bereits gezeigt worden, dass *myo5* nicht essentiell, jedoch für die Morphogenese und Zelltrennung haploider Sporidien von Bedeutung ist (Gruber, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Myo5 für die Konjugationshyphenausbildung, die Filamentbildung und die Pathogenität näher untersucht. Die Bildung der Konjugationshyphen wird durch die Perzeption des kompatiblen Kreuzungspheromons initiiert (Spellig et al., 1994; Snetselaar et al., 1996). Auf die erfolgte Pheromonperzeption reagiert die Zelle u. a. mit verstärkter Expression des eigenen Pheromons durch Induktion des *mfa*-Promotors (Urban et al., 1996).

Die Fähigkeit der Zellen, Pheromon zu detektieren, wurde mit Hilfe eines *pmfa1GFP* Reporterkonstrukts (Spellig et al., 1996) näher analysiert. Dieses Konstrukt trägt die kodierende Sequenz des GFPs unter Kontrolle des *mfa1*-Promotors. Für die durchgeführten Versuche wurden kompatible Wildtypstämme verwendet, die dieses Konstrukt trugen (Spellig et al., 1996). Ein analoges Plasmid mit anderer Resistenz (*pmfa1GFP-B*) wurde hergestellt und in kompatible *myo5^{ts}*-Stämme integriert. Die resultierenden Stämme GS1Myo5^{ts}mG und FB2Myo5^{ts}mG sowie FB1mG und FB2mG wurden in Konfrontationstests näher untersucht.

In den durchgeführten Tests wurden die verschiedenen Partner mit einer Distanz von ca. 200 µm zueinander auf Wasseragar aufgetragen (vgl. Materialien und Methoden). Nach 12-14 h konnte die Konjugationshyphenbildung mikroskopisch analysiert werden (Snetselaar et al., 1996). Erwartungsgemäß zeigten Zellen gleichen „Matingtyps“ (FB2mG und FB2mG) weder GFP-Fluoreszenz noch die Bildung von Konjugationshyphen (Abb. 7, A1). Im Konfrontationstest der kompatiblen Stämme FB1 und FB2mG bildeten beide Partner Konjugationshyphen aus. GFP-Fluoreszenz wurde aber nur bei dem Reporterstamm FB2mG beobachtet (Abb. 7, A2). Ebenso bildeten auch die Stämme FB1mG und FB2mG sowohl bei 20°C als auch bei 28°C Konjugationshyphen aus, wobei in diesem Fall beide Stämme GFP-Fluoreszenz zeigten (Abb. 7, A3 und A4).

Kompatible *myo5^{ts}*-Stämme zeigten bereits erste Defekte bei permissiver Temperatur (20°C). Bei einer Distanz von ca. 200 µm wiesen nur wenige Zellen GFP-Fluoreszenz auf,

und Konjugationshyphen wurden nicht ausgebildet (Abb. 7, A5). Bei einer auf 40 µm reduzierten Distanz zwischen beiden Partnern zeigten deutlich mehr Zellen GFP-Fluoreszenz. Dennoch wurden nur wenige und deutlich kürzere, in Richtung des Partners wachsende Konjugationshyphen gebildet (Abb. 7, A6). Bei restriktiver Temperatur (28°C) war die Konjugationshyphenbildung bei dem geringen Abstand von ca. 40 µm sogar vollständig unterdrückt (Abb. 7, A7). Diese Versuche wiesen auf Defekte in der Pheromonerkennung oder -sekretion sowie in der Ausbildung von Konjugationshyphen hin. Zur Klärung der Frage, ob die beobachteten Defekte von *myo5^{ts}*-Zellen auf eine Störung der Pheromonsekretion oder der Pheromonperzeption zurückzuführen waren, wurde die Kreuzungsreaktion FB1mG gegen FB2Myo5^{ts}mG bei 20°C getestet. Dabei zeigte FB1mG eine der Kontrollreaktion FB1mG ↔ FB2mG¹ vergleichbare GFP-Fluoreszenz und eine vergleichbare Konjugationshyphenbildung (Abb. 7, A8).

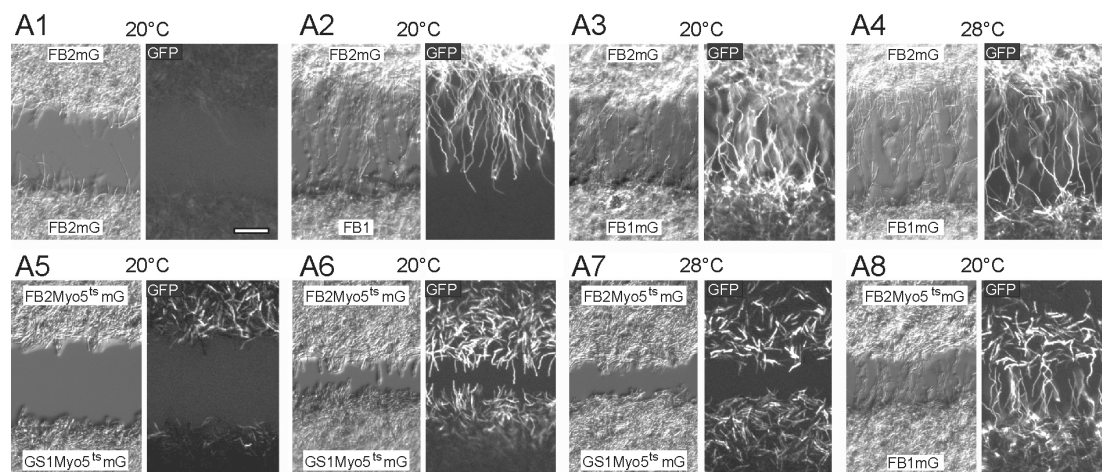


Abb. 7: Defekte von *myo5^{ts}*-Mutanten im Konfrontationstest.

Zellen gleichen „Matingtyps“ zeigten im Konfrontationstest weder durch Mfa induzierte GFP-Expression noch Konjugationshyphenbildung (A1). Hingegen bildeten zwei kompatible Stämme, von denen nur einer das Reporterkonstrukt trug, im Konfrontationstest Konjugationshyphen aus. GFP-Fluoreszenz zeigte dabei nur der Reporterstamm FB2mG (A2). Wurden zwei kompatible Wildtypreporterstämme verwendet, wiesen beide sowohl bei 20°C als auch bei 28°C GFP-Fluoreszenz und Konjugationshyphen auf (A3 und A4). Kompatible *myo5^{ts}*-Zellen hingegen bildeten bei permissiver Temperatur und vergleichbarer Distanz keine Konjugationshyphen und zeigten nur geringe Fluoreszenz (A5). Eine geringere Distanz zwischen den Partnern erhöhte die Fluoreszenz, und kurze Konjugationshyphen konnten beobachtet werden (A6). Unter restriktiven Bedingungen war die Bildung der Konjugationshyphen von *myo5^{ts}*-Zellen gestört (A7). FB2Myo5^{ts}-Zellen waren jedoch in der Lage, den kompatiblen Wildtypstamm FB1mG zu stimulieren (A8). Balken in A1 = 50 µm.

¹ FB1mG ↔ FB2mG bedeutet, dass hier ein Konfrontationstest von FB1mG und FB2mG durchgeführt wurde.

Dies deutet an, dass FB2Myo5^{ts}mG-Zellen in der Lage waren, FB1mG-Zellen zu stimulieren, was für die Pheromonbildung und ungestörte Sekretion spricht. Zudem zeigte FB2Myo5^{ts}mG ähnlich wie im Versuch GS1Myo5^{ts}mG ↔ FB2Myo5^{ts}mG eine reduzierte GFP-Fluoreszenz und Konjugationshyphenbildung (Abb. 7, A5 und A6). Dies legt nahe, dass die beobachteten Defekte von *myo5^{ts}*-Zellen auf Störungen der Pheromonperzeption und nicht auf Störungen der Pheromonsekretion zurückgehen.

Die Stimulation von *myo5^{ts}*-Zellen mit synthetischem Pheromon in Flüssigkultur bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 8, in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg). Dabei wurde Flüssigmedium mit synthetischem Pheromon versetzt, wodurch eine ausreichende Pheromonkonzentration gewährleistet wurde und somit eventuelle Sekretionsdefekte des Partners als Ursache der reduzierten Stimulation ausgeschlossen werden konnten.

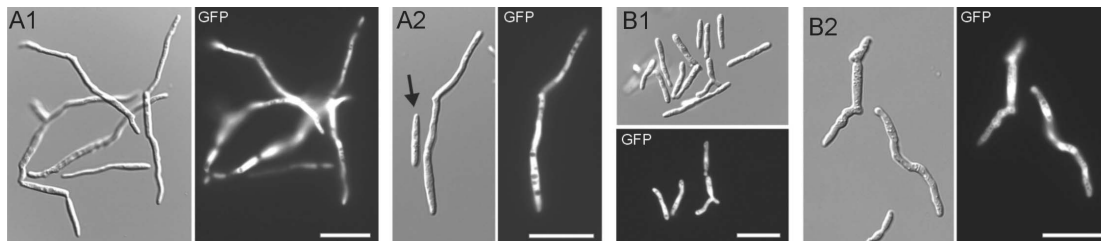


Abb. 8: Pheromonstimulation von FB2mG und FB2Myo5^{ts}mG.

Stimulation mit synthetischem a1-Pheromon für 8 h bei 20°C induzierte bei dem Kontrollstamm FB2mG die GFP-Expression und Ausbildung von Konjugationshyphen (A1). Selten konnten Zellen beobachtet werden, die keine Fluoreszenz zeigten, dann aber nicht filamentös wuchsen (A2). Nach 8 h bei 20°C waren deutlich weniger FB2Myo5^{ts}-Zellen stimuliert. Filamentöse Strukturen konnten nicht beobachtet werden (B1). Nach Stimulation für 14 h bildeten stimulierte Zellen kurze Konjugationshyphen aus (B2). Balken in A1, A2, B1 und B2 = 20 µm.

Bei Stimulation von FB2mG für acht Stunden bei 20°C reagierten fast alle Zellen auf das a1-Pheromon mit der Ausbildung von Konjugationshyphen ($82,5 \pm 7,4\%$ der Zellen, 140 Zellen in zwei Experimenten, Abb. 8, A1 und A2), wobei mit Ausnahme von einer Hyphe alle auch GFP-Fluoreszenz zeigten. Unter gleichen Bedingungen wurde nur weniger als ein Drittel der *myo5^{ts}*-Mutanten stimuliert (GFP-Signal in $28,6 \pm 7,6\%$ aller Zellen, 180 Zellen in zwei Experimenten, Abb. 8, B1), und Konjugationshyphen wurden nicht gebildet. Eine Stimulation für weitere sechs Stunden, d. h. für insgesamt 14 Stunden entsprechend der Dauer des Konfrontationstests, erhöhte die Anzahl fluoreszierender Zellen nicht, führte aber zur Bildung kurzer Konjugationshyphen (Abb. 8, B2). Die Länge dieser Hyphen war mit der Länge der im Konfrontationstest beobachteten *myo5^{ts}*-Konjugationshyphen nahezu identisch (Zelllänge im Konfrontationstest: $43,9 \pm 8 \mu\text{m}$, $n = 13$; Zelllänge in Flüssigstimulationen: $47,7 \pm 5,8 \mu\text{m}$; T-Test: nicht unterschiedlich $P: 0,3004$), was

vermutlich auf die vergleichbar lange Pheromonbehandlung zurückging. Zusammenfassend legen Konfrontations- und Pheromonversuche nahe, dass *myo5^{ts}*-Zellen in der Pheromondetektion und Konjugationshyphenausbildung gestört sind.

Zur Analyse von Δ *myo5*-Zellen wurde ein weiterer, vergleichbarer Konfrontationstest mit den Stämmen FB1mG und FB2 Δ *myo5* durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass Δ *myo5*-Zellen ähnlich wie *myo5^{ts}*-Zellen (Abb. 7, A8) in der Lage waren, FB1mG-Zellen zu stimulieren, die daraufhin Konjugationshyphen ausbildeten (Abb. 9). Auch hier war die Distanz zwischen beiden Partner entscheidend. Im Unterschied zu *myo5^{ts}*-Zellen zeigten die Δ *myo5*-Zellen jedoch keine morphologischen Veränderungen, die auf Konjugationshyphen hinweisen konnten.

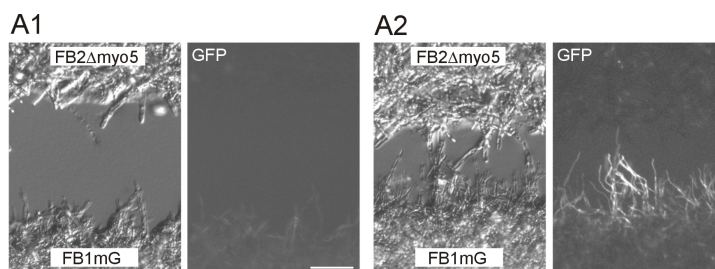


Abb. 9: Konfrontationstest von FB1mG und FB2 Δ *myo5*.

FB2 Δ *myo5* konnte im Konfrontationstest FB1mG bei einer Distanz von ca. 130 μ m nicht signifikant stimulieren (A1). Bei geringerem Abstand zwischen den Partnern zeigte FB1mG GFP-Fluoreszenz, und Konjugationshyphen wurden ausgebildet (A2). Balken in A1 = 50 μ m.

Zur Prüfung der Pheromonperzeption von Δ *myo5*-Zellen wurde das Plasmid pmfa1GFP-B in Δ *myo5*-Zellen integriert und der resultierende Stamm FB2 Δ *myo5*mG mit synthetischem a1-Pheromon stimuliert. Dabei zeigten im Gegensatz zu *myo5^{ts}*-Zellen (Abb. 8) nur wenige, vermutlich alte oder bereits tote Δ *myo5*-Zellen eine schwache GFP-Fluoreszenz (Abb. 10). Um Integrations- oder Sequenzfehler des Reporterkonstrukts ausschließen zu können, wurde das Plasmid pMGMyo5 in den Stamm FB2 Δ *myo5*mG transformiert. Die Integration dieses Plasmids führte zu der Expression eines GFPMyo5-Fusionsproteins unter Kontrolle des *myo5*-Promotors und resultierte in dem Stamm FB2 Δ *myo5*mG-MGMyo5. Wie erwartet, führte die Expression dieses funktionellen GFPMyo5-Fusionsproteins in FB2 Δ *myo5*mG zur vollständigen Rettung des Deletionsphänotyps. In parallelen Ansätzen wurden sodann die Stämme FB2mG, FB2 Δ *myo5*mG und FB2 Δ *myo5*mG-MGMyo5 erneut mit Pheromon stimuliert und nach ca. acht Stunden mikroskopiert. Alle Fluoreszenz-Fotos wurden unter gleichen Bedingungen –

Lampenintensität, Belichtungsdauer, Skalierung, etc. – aufgenommen und auch durch Bildverarbeitungsprogramme nachträglich nicht mehr verändert.

Stimulierte Zellen von FB2 Δ myo5mG verhielten sich dabei ähnlich wie die Zellen im Kontrollexperiment, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt worden waren. Morphologische Veränderungen, die eine Konjugationshyphenausbildung andeuteten, wurden nicht beobachtet (Abb. 10, A und B). Die beobachtete Hintergrundfluoreszenz fand sich auch in nicht stimulierten FB2mG-Zellen (Abb. 10, C2, Kontrollansatz mit DMSO).

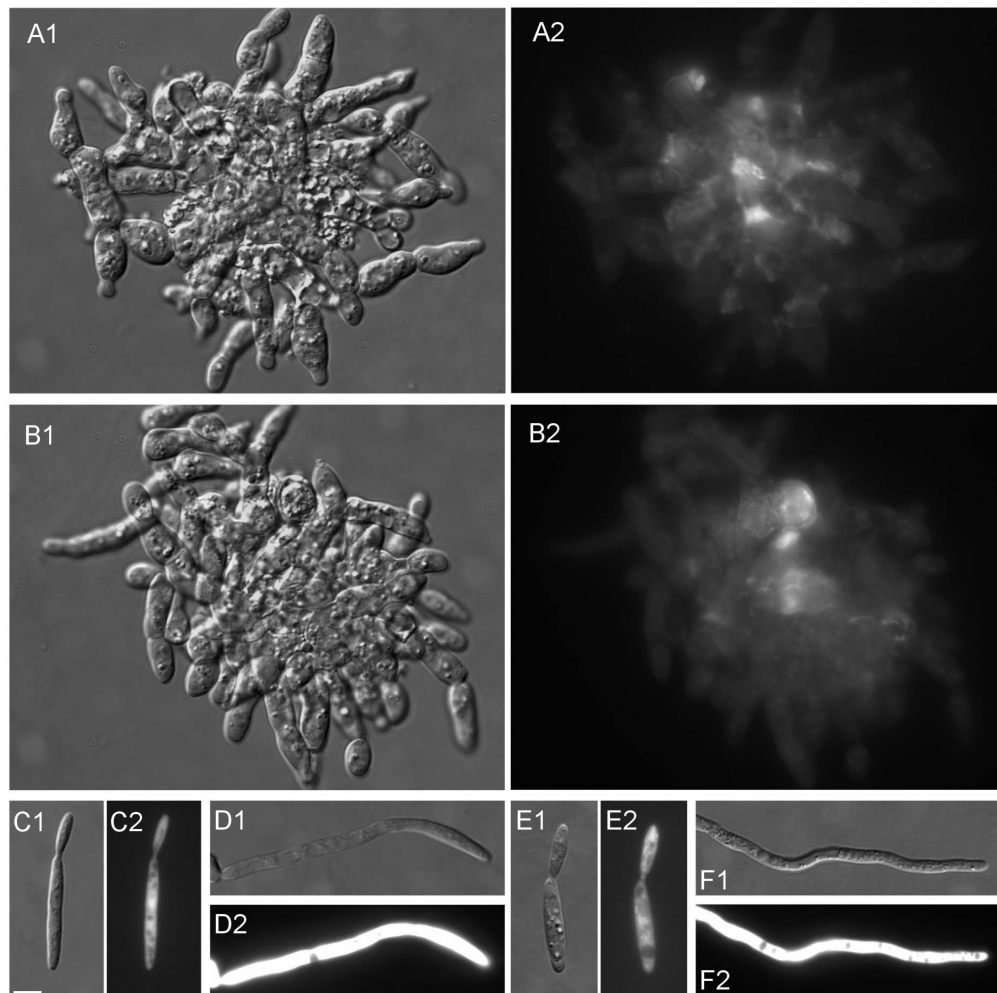


Abb. 10: Pheromonstimulation von FB2mG, FB2 Δ myo5mG und FB2 Δ myo5mG-MGMyo5.

FB2 Δ myo5mG-Zellen zeigten nach a1-Pheromonstimulation (B) keine stärkere GFP-Fluoreszenz als Kontrollzellen (A). In den Zellen beider Ansätze war lediglich eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu erkennen, die auch in nicht stimulierten FB2mG-Zellen vorhanden war (C1 und C2). Nach 7-8 h Stimulation zeigten FB2mG-Zellen eine hohe GFP-Fluoreszenz und reagierten ebenfalls auf das synthetische Pheromon mit der Bildung von Konjugationshyphen (D1 und D2). Ebenso verhielt sich der Stamm FB2 Δ myo5mG-MGMyo5, bei dem nach Pheromonbehandlung starke Fluoreszenz und Konjugationshyphen beobachtet werden konnten (F, vgl. dazu DMSO-Kontrolle E). Balken in C1 = 5 μ m.

Stimulation von FB2mG mit synthetischem a1-Pheromon führte hingegen zu einer starken GFP-Expression und Ausbildung von Konjugationshyphen (Abb. 8, A und Abb. 10, D2). Ähnlich wie FB2mG verhielt sich auch der Stamm FB2Δmyo5mG-MGMyo5. Im unstimulierten Zustand zeigte dieser ebenfalls nur eine leichte Hintergrundfluoreszenz (Abb. 10, E1 und E2), wohingegen die Stimulation mit synthetischem Pheromon eine starke GFP-Fluoreszenz und Konjugationshyphenbildung induzierte (Abb. 10, F1 und F2). Dies bedeutet, dass die ausbleibende Stimulation bzw. GFP-Expression von FB2Δmyo5mG nicht auf Defekte des Reporterkonstrukts oder eine fehlerhafte Integration zurückgeht.

Die durchgeführten Konfrontationstests sowie die Stimulationen mit synthetischem Pheromon zeigten übereinstimmend deutliche Defekte von *myo5^{ts}*- und *Δmyo5*-Zellen in der Pheromonperzeption und Konjugationshyphenbildung. 30% der mit a1-Pheromon stimulierten FB2Myo5^{ts}mG-Zellen zeigten GFP-Fluoreszenz (Abb. 8), während im starken Gegensatz hierzu der Stamm FB2Δmyo5mG nicht in der Lage war, Pheromon zu perzipieren. Da die nicht erfolgte Pheromonperzeption von FB2Δmyo5mG auch eine ausbleibende Erhöhung der endogenen Pheromonexpression bedingte, könnte dies die schlechte Stimulation von FB1mG durch FB2Δmyo5mG im Konfrontationstest erklären. Die überraschende Diskrepanz in der Stimulierbarkeit von *myo5^{ts}*- und *Δmyo5*-Zellen könnte weitere Hinweise auf die Funktion von Myo5 im Zell-Zellerkennungsprozess liefern, zumal andere Versuche mit GFPMyo5^{ts} ergaben, dass Myo5 in *myo5^{ts}*-Zellen nach Temperaturerhöhung noch vorhanden ist (vgl. 2.2.6.1).

2.1.3 GFPMyo5-Lokalisation in der Hyphe ist unabhängig von Kin2

In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass sich ein GFPMyo5-Fusionsprotein als punktuelles Signal in der Spitze dikaryotischer Hyphen befindet. Diese Spitzenlokalisation war aktinabhängig, da sie eine Sensitivität gegenüber Latrunculin A zeigte (Weber et al., 2003). Die Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts durch Benomyl resultierte in einem zwar noch polaren, aber nicht mehr fokussierten GFPMyo5-Signal (Weber et al., 2003). Dies legt nahe, dass mikrotubuliabhängige Transportprozesse an der Fokussierung von GFPMyo5 in der Hyphenspitze beteiligt sind. Da von höheren Eukaryonten die Interaktion eines Klasse V Myosins mit einem konventionellen Kinesin bekannt ist (Huang et al., 1999) und das Genom von *U. maydis* ein konventionelles Kinesin, Kin2, enthält (Lehmle et al., 1997), wurde untersucht, ob Kin2 Einfluss auf die GFPMyo5-Verteilung in Hyphen

hat. Dazu wurde das Plasmid pOGMyo5H hergestellt und in die Stämme SG200 und SG200 Δ kin2 integriert, was in den Stämmen SG200OGMyo5 und SG200 Δ kin2OGMyo5 resultierte. Der haploide Stamm SG200 wächst auf aktivkohlehaltigen Agarplatten filamentös (Abb. 11, A), während SG200 Δ kin2 nur zu einer reduzierten Filamentbildung befähigt ist (Steinberg, unveröffentlicht). Zellen des Stamms SG200 Δ kin2OGMyo5 zeigten ebenfalls eine reduzierte Filamentbildung auf aktivkohlehaltigen Platten (Abb. 11, A). In diesen Δ kin2-Hyphen konnte ähnlich wie in dem Stamm SG200OGMyo5 (nicht gezeigt) ein in der Hyphenspitze fokussiertes GFPMyo5-Signal beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass das konventionelle Kinesin Kin2 für die Spitzenlokalisation von GFPMyo5 in dikaryotischen Hyphen nicht von Bedeutung ist.

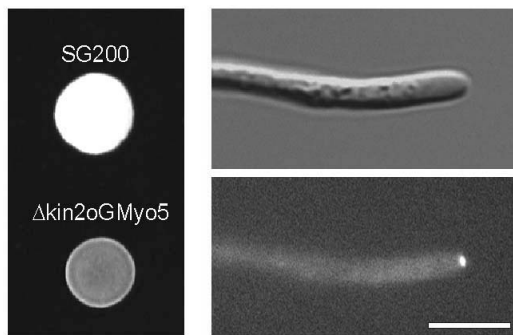


Abb. 11: Lokalisation von GFPMyo5 in SG200 Δ kin2.

Auf aktivkohlehaltigen Platten bildete der Kontrollstamm SG200 weiße, pelzartige Kolonien (A). Der Stamm SG200 Δ kin2OGMyo5 bildete deutlich weniger Filamente, was zu einer grauen, nicht pelzartigen Koloniemorphologie führte (A). In Flüssigkulturen zeigten diese Filamente ein GFPMyo5-Signal in der Hyphenspitze. Balken in B = 5 μ m. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.1.4 *myo5^{ts}*-Mutanten zeigen reduzierte Filamentbildung

Die durchgeführten Konfrontationstests und Pheromonstimulationen zeigten, dass Myo5 für den Kreuzungsprozess essentiell ist. Um die Bedeutung von Myo5 für das Wachstum dikaryotischer Hyphen näher zu beleuchten, wurden kompatible Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Stämme auf aktivkohlehaltigem Medium gekreuzt. Die Kreuzung kompatibler Wildtypstämme (FB1 und FB2) führte zu der typischen weißen, pelzartigen, sog. „fuzzy“ Koloniemorphologie, die auf die Bildung vieler dikaryotischer Hyphen zurückzuführen ist (Holliday, 1974). Inkubation einer Mischung von FB1 und FB2 Δ myo5 auf Charcoal-Platten resultierte in einer stark reduzierten Filamentbildung (Abb. 12, WT x Δ myo5). Durch Expression von GFPMyo5 in Δ myo5-Zellen konnte dieser Defekt wieder aufgehoben werden (Abb. 12, WT x Δ myo5GFPMyo5). In Kreuzungen von Wildtyp- mit *myo5^{ts}*-Zellen wurden sowohl bei permissiver Temperatur als auch bei restriktiver Temperatur die charakteristischen weißen „fuzzy“ Kolonien gebildet (Abb. 12, WT x Myo5^{ts}, 20°C und 28°C). Nach Kreuzung kompatibler *myo5^{ts}*-Stämme und anschließender

Inkubation bei permissiver Temperatur konnte allerdings eine Reduktion der Filamentbildung beobachtet werden, die bei Inkubation unter restriktiven Bedingungen (28°C) vollständig ausblieb und zu grauen, glänzenden Kolonien führte (Abb. 12, Myo5^{ts} x Myo5^{ts} 28°C). Diese Defekte in der Filamentbildung sowohl bei 20°C als auch bei 28°C erklären sich vermutlich durch die oben beschriebene essentielle Rolle von Myo5 für die Konjugationshyphenbildung.

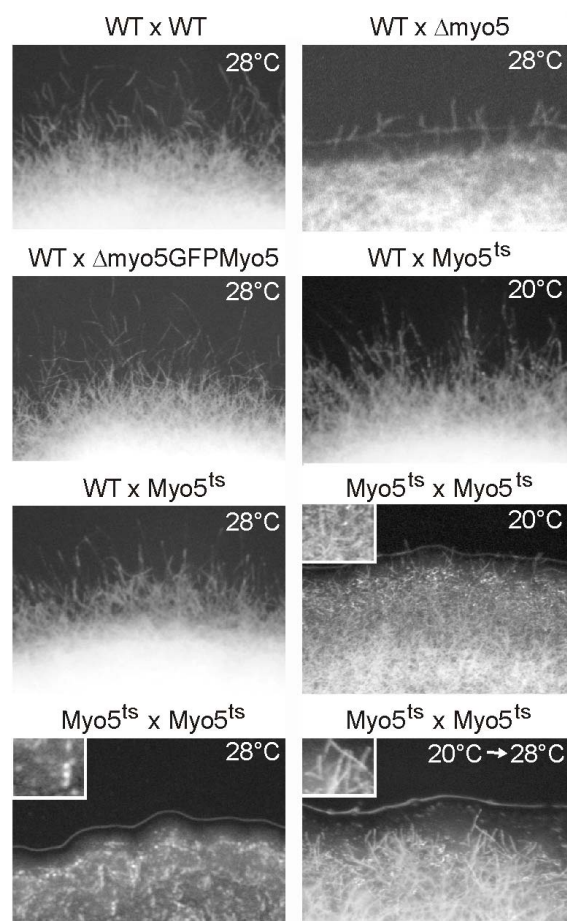


Abb. 12: Bildung dikaryotischer *myo5^{ts}*-Hyphen auf aktivkohlehaltigen Platten.

Kompatible Wildtypstämme (WT x WT, 28°C) bildeten weiße, pelzartige Kolonien. Abgebildet sind die Ränder dieser Kolonien. Die Kreuzung von Wildtyp- und $\Delta myo5$ -Zellen führte zu einer drastischen Reduktion der Filamentbildung (WT x $\Delta myo5$). Durch Expression eines funktionellen GFPMyo5-Fusionsproteins konnte die Wildtypsituation wieder hergestellt werden (WT x $\Delta myo5$ GFPMyo5). Kreuzungen von Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Stämmen zeigten keine Defekte in der Filamentbildung, weder bei 20°C noch bei 28°C (WT x Myo5^{ts}, 20°C und 28°C). Die Bildung dikaryotischer Hyphen war jedoch stark reduziert, wenn kompatible *myo5^{ts}*-Stämme gekreuzt und bei 20°C inkubiert wurden (Myo5^{ts} x Myo5^{ts}, 20°C). Bei restriktiver Temperatur wurden keine Hyphen gebildet (Myo5^{ts} x Myo5^{ts}, 28°C). Zur Analyse dikaryotischer *myo5^{ts}*-Hyphen unter restriktiven Bedingungen wurden die Kreuzungen zunächst zwei Tage bei 20°C und dann über Nacht bei 28°C inkubiert (Myo5^{ts} x Myo5^{ts}, 20°C → 28°C). Nach erfolgter Fusion bei 20°C störte eine anschließende Inkubation bei 28°C die Filamentbildung nicht.

2.1.5 Myo5 ist wichtig für die Morphogenese dikaryotischer Hyphen

Um die initialen Defekte in der Pheromondetektion und Konjugationshyphenbildung von *myo5^{ts}*-Zellen sowie die sich daraus ergebende Reduktion in der Filamentbildung zu umgehen und dikaryotische *myo5^{ts}*-Hyphen auch unter restriktiven Bedingungen untersuchen zu können, wurden kompatible *myo5^{ts}*-Stämme bei 20°C für zwei Tage und dann für einen weiteren Tag bei 28°C inkubiert (Abb. 12, Myo5^{ts} x Myo5^{ts}, 20°C → 28°C). In diesen Kreuzungen wurden Konjugationshyphen gebildet, die nach Fusion miteinander

Filamente ausbildeten. Um sicherzustellen, dass diese Hyphen wirklich aus der Fusion zweier kompatibler Stämme stammten und keine haploiden Stressfilamente darstellten (Brefeld, 1883), wurden Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Stämme verwendet, bei denen ein Partner cytoplasmatisches YFP und der kompatible Stamm cytoplasmatisches CFP exprimierte (FB1Y, FB2C, GS1Myo5^{ts}Y und FB2Myo5^{ts}C, Abb. 13, A). Diese kompatiblen Partner wurden jeweils auf aktivkohlehaltigem Medium gekreuzt. Resultierende Wildtyp- als auch *myo5^{ts}*-Hyphen zeigten bei 20°C sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz (Abb. 13, B und C), wodurch bestätigt wurde, dass es sich um dikaryotische Hyphen handelte.

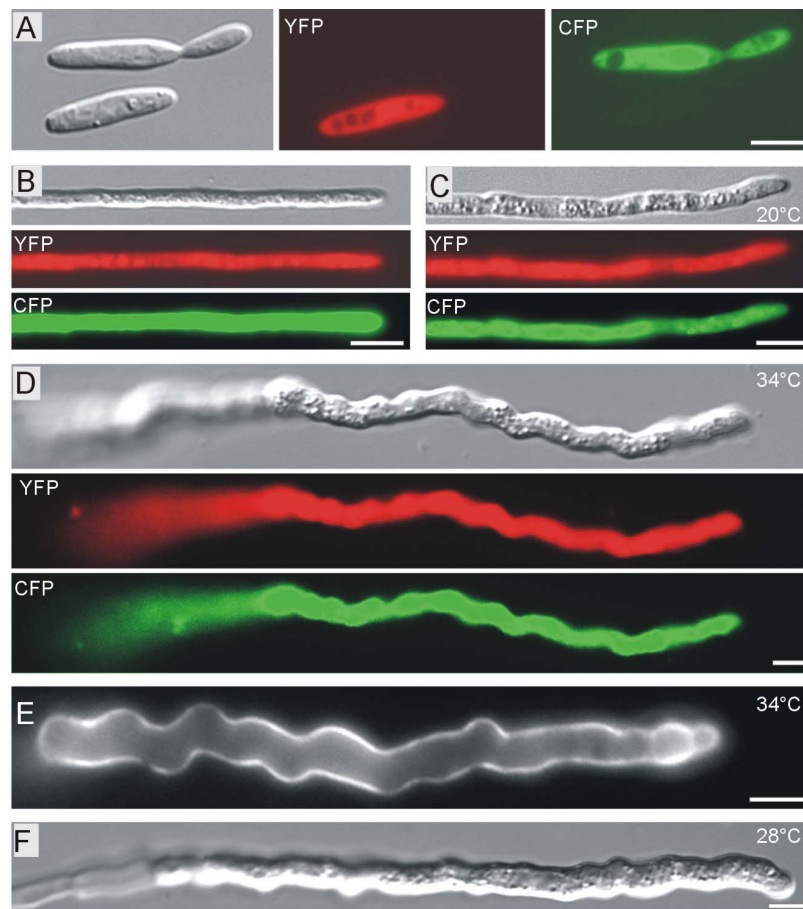


Abb. 13: Dikaryotische Wildtypphyphen und *myo5^{ts}*-Hyphen.

Die Expression von CFP und YFP in kompatiblen Stämmen ermöglichte es, Matingpartner zu identifizieren (A). Die Fusion zweier kompatibler Wildtypstämme resultierte in einer Hyphe, die sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz zeigte (B). Als Resultat einer Zellfusion kompatibler *myo5^{ts}*-Stämme konnten zweifarbige, leicht unregelmäßig geformte Hyphen beobachtet werden (C). Wurden diese Hyphen für einen weiteren Tag bei restriktiver Temperatur inkubiert, war eine Verdickung und unregelmäßiges Wachstum zu erkennen (D). Die verdickten Hyphen zeigten über ihre vollständige Länge eine starke Chitinverteilung, gefärbt durch WGA (E). Auch nach Temperaturerhöhung auf 28°C zeigte dikaryotische *myo5^{ts}*-Hyphen eine ungleichmäßige, verdickte Form. E und F wurden von Dr. G. Steinberg zur Verfügung gestellt. Balken in A-F = 5 µm.

Nachdem die bei 20°C gebildeten dikaryotischen *myo5^{ts}*-Hyphen für einen weiteren Tag bei 34°C inkubiert wurden, war eine Verdickung der Hyphen erkennbar. Diese Hyphen wuchsen zwar immer noch polar, zeigten aber eine deutlich gestörte Hyphenmorphologie. Im Gegensatz zu typischen Wildtyphyphen, die Chitin an der wachsenden Hyphenspitze akkumulieren, deutete die Chitin-Färbung durch WGA eine gestörte Zellwandzusammensetzung dikaryotischer *myo5^{ts}*-Hyphen bei 34°C an (Abb. 13, E). Vergleichbare Hyphen konnten auch nach Anhebung der Temperatur von 20°C auf 28°C beobachtet werden (Abb. 13, F). Dies zeigte, dass Myo5 notwendig für die Morphogenese dikaryotischer Hyphen, jedoch nicht essentiell für polares Hyphenwachstum ist.

2.1.6 *myo5^{ts}*-Stämme sind in der Pathogenität reduziert

Um in einem nächsten Schritt die Frage zu klären, ob die oben beschriebenen Defekte von *myo5^{ts}*-Zellen in der Pheromonperzeption und Konjugationshyphenbildung sowie in der Morphogenese dikaryotischer Hyphen von Relevanz für die Virulenz von *Ustilago maydis* sind, wurden Infektionsstudien durchgeführt. Dafür wurden Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam mit kompatiblen Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Zellen infiziert, die zuvor bei permissiver Temperatur (20°C) angezogen worden waren. Nach der Infektion wurden die Maispflanzen in einer Phytokammer für 13-17 Tage bei 20°C und 28°C inkubiert. Alle mit Wildtypzellen infizierten Pflanzen (n = 32 bzw. 39) zeigten bei beiden Temperaturen Anthocyanbildung, und über 80% der infizierten Pflanzen bildeten sowohl bei 20°C als auch bei 28°C Tumore aus (Tabelle 1). In *myo5^{ts}*-Infektionen hingegen zeigten bereits bei 20°C nur 19,4% der Pflanzen Anthocyanbildung, und nur ein einziger Tumor wurde gebildet. Die Erhöhung der Temperatur auf 28°C verhinderte sowohl Anthocyan- als auch Tumorbildung, und auch eine verlängerte Inkubation für weitere acht Tage erhöhte die Anzahl der Symptome nicht (Tabelle 1). Zur Klärung der Frage, warum *myo5^{ts}*-Zellen bereits bei 20°C eine reduzierte Pathogenität zeigten, wurden erneut Maispflanzen infiziert.

Tabelle 1: Analyse der Pathogenität von *myo5^{ts}*-Mutanten.

Inokulum	20°C*			28°C**		
	Anthocyan- bildung	Tumore		Anthocyan- bildung	Tumore	
FB1 x FB2	100%	96,9%	(32)	100%	82%	(39)
GS1Myo5 ^{ts} x FB2Myo5 ^{ts}	19,4%	2,7%	(36)	0%	0%	(36)

*Pflanzen wurden 17 Tage nach Infektion bonitiert

**Pflanzen wurden 13 Tage nach Infektion bonitiert

In Klammern angegeben: Zahl der analysierten Pflanzen

Zur leichteren Visualisierung des Pilzes auf der Pflanzenoberfläche wurden die Stämme FB1Y und FB2C bzw. GS1Myo5^{ts}Y und FB2Myo5^{ts}C für die Pflanzeninfektionen verwendet (vgl. 2.1.5). Nach erfolgter Infektion wurden die Maispflanzen bei 20°C in einer Phytokammer inkubiert. Zwei Tage nach der Infektion mit FB1Y und FB2C war auf der Pflanzenoberfläche bereits ein dichtes Hyphennetzwerk sichtbar (Abb. 14, A1).

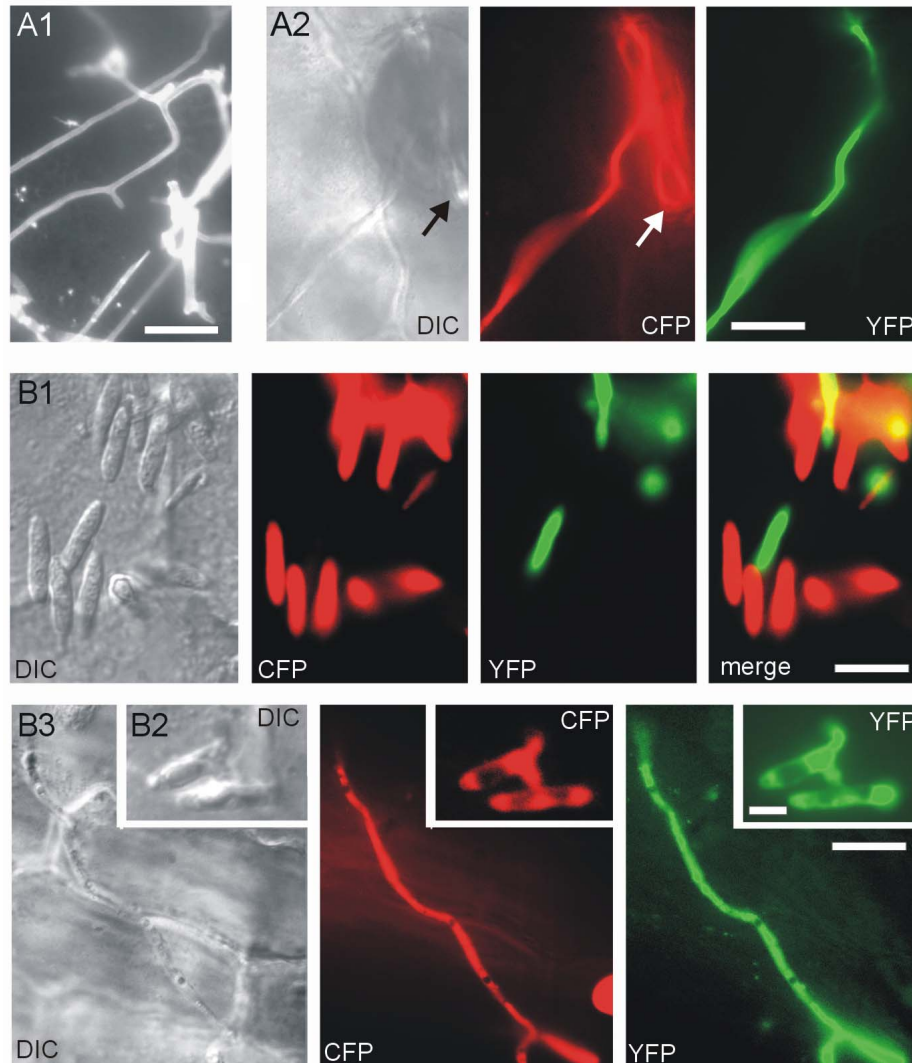


Abb. 14: Kompatible Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Stämme auf der Pflanzenoberfläche zwei Tage nach Infektion bei 20°C.

Wurden Maispflanzen mit kompatiblen Wildtypstämmen infiziert, konnte zwei Tage nach der Infektion bereits ein Hyphennetzwerk auf der Pflanzenoberfläche durch Calcofluor-Färbung beobachtet werden (A1). Diese Wildtyphyphen waren dikaryotisch, da sie sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz aufwiesen (A2). Infektionen mit kompatiblen *myo5^{ts}*-Zellen, die CFP bzw. YFP exprimierten, zeigten, dass der überwiegende Teil der *myo5^{ts}*-Zellen nicht fusionierte. In seltenen Fällen konnten aber Fusionsstrukturen beobachtet werden, die sowohl CFP als auch YFP exprimierten (B2). Als Resultat dieser Fusionen wurden lange dikaryotische Hyphen gebildet, die vergleichbar mit den auf aktivkohlehaltigen Agarplatten gebildeten Hyphen waren (B3). Balken in A = 10 µm, in B1 und B3 = 10 µm, in B2 = 5 µm.

Diese Wildtypphyphen zeigten sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Fusion von FB1Y und FB2C stattgefunden hatte (Abb. 14, A2). Im Gegensatz dazu war zwei Tage nach Injektion kompatibler *myo5^{ts}*-Zellen kein Hyphennetzwerk auf der Pflanzenoberfläche zu finden. Vielmehr wurden häufig eng nebeneinanderliegende Zellen unterschiedlicher „Matingtypen“ beobachtet, ohne dass diese jedoch miteinander fusioniert waren. Nur in einzelnen Fällen konnten Fusionsstrukturen und dikaryotische Hyphen gesehen werden (Abb. 14, B2).

Die reduzierte Hyphenanzahl legt nahe, dass die beobachteten Defekte in der Pheromonperzeption und der Konjugationshyphenausbildung (vgl. 2.1.4) auch auf der Pflanzenoberfläche auftreten und daher Ursachen der stark reduzierten Bildung dikaryotischer Hyphen sein könnten.

2.1.7 *myo5^{ts}*-Stämme haben Defekte in der frühen Infektionsphase

Das seltene Auftreten von Fusionsereignissen und somit auch dikaryotischer Hyphen bei 20°C kann erklären, warum nur 19,4% der mit *myo5^{ts}*-Zellen infizierten Pflanzen Anthocyan bildeten (Tabelle 1). Da diese Reaktion als Zeichen des erfolgreichen Eindringens des Pilzes gilt (Banuett und Herskowitz, 1996), bleibt allerdings zu fragen, warum nur 2,7% der infizierten Pflanzen Tumore ausgebildet hatten.

Zur Aufklärung dieses Phänomens wurde eine auf Chlorazole Black E basierende Färbemethode angewendet (Brundett et al., 1996; Brachmann et al., 2003a), die es ermöglichte, Pilzhypen innerhalb der Pflanze sichtbar zu machen. Ein bis sechs Tage nach der Infektion wurden Blattpräparate infizierter Pflanzen angefertigt und auf Infektionsstrukturen hin untersucht. In Präparaten einen Tag nach der Pflanzeninfektion waren Wildtypphyphen bereits in die Epidermis und das darunterliegende Mesophyll eingedrungen (Abb. 15, A). Im Gegensatz dazu konnten vergleichbare *myo5^{ts}*-Hyphenstrukturen erst sechs Tage nach Infektion gefunden werden. Aus diesen Versuchen kann folglich geschlossen werden, dass *myo5^{ts}*-Hyphen in der Lage waren, Pflanzen zu infizieren, allerdings zeitlich verzögert und nur in geringer Anzahl. Die *myo5^{ts}*-Infektionshyphen zeigten eine starke Verdickung und Verzweigung im Mesophyll (Abb. 15, B). Der Unterschied der beiden Infektionsstrukturen, von Wildtypphyphen einerseits und *myo5^{ts}*-Hyphen andererseits, wird in der Gegenüberstellung in Abb. 15 C besonders deutlich: Die Infektionshyphe des Wildtyps wuchs innerhalb der Pflanze polar über eine lange Distanz, wohingegen sich die *myo5^{ts}*-Hyphe unmittelbar nach Eindringen

in die Pflanze verzweigte. Die Infektion schien in der Nähe der Eintrittsstelle zum Erliegen zu kommen. Spätere Infektionsstrukturen von *myo5^{ts}*-Hyphen konnten nicht gefunden werden. Myo5 scheint somit für den erfolgreichen Infektionsprozess von besonderer Wichtigkeit zu sein.

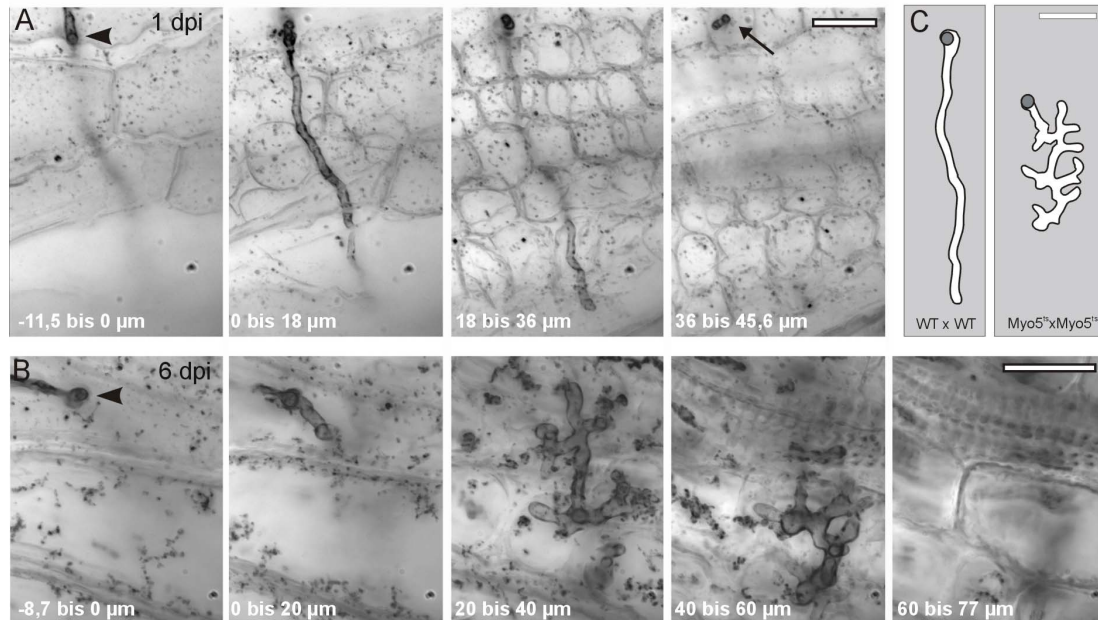


Abb. 15: Frühe Infektionsstrukturen von Wildtyp- und *myo5^{ts}*-Hyphen.

A: Serien minimaler Z-Achsenprojektionen zeigen die Aufsicht auf eine Infektionsstruktur des Wildtyps bei 20°C. Einen Tag nach der Infektion (1 dpi) war bereits eine Appressorien-ähnliche Struktur ausgebildet (-11,5 bis 0 μm). Diese drang als unverzweigte Hyphe in die Pflanze ein (0 bis 18 μm) und durchwuchs die Epidermis und das darunterliegende Mesophyll (18 bis 36 μm). Darüber hinaus war die Hyphe in der Lage, in tiefere Blattregionen einzudringen. Eine vergleichbare Infektionsstruktur von *myo5^{ts}*-Hyphen konnte in Pflanzen erst sechs Tage nach Infektion gefunden werden. Balken = 10 μm.

B: *myo5^{ts}*-Hyphen in der Pflanze sechs Tage nach der Infektion. Dargestellt sind wiederum Z-Achsenprojektionen der angegebenen Ebenen (B). Ein Appressorium wurde gebildet (-8,7 bis 0 μm), und die Infektionshyphe wuchs gerade durch die Pflanzenepidermis hindurch (0 bis 20 μm). Innerhalb der Pflanze kam es jedoch zur Ausbildung vieler geschwollener Hyphenverzweigungen (20 bis 40 μm, 40 bis 60 μm, 60 bis 77 μm). Balken = 10 μm.

C: Die Gegenüberstellung der Projektion von 456 Ebenen (WT x WT) bzw. 771 Ebenen (*Myo5^{ts}* x *Myo5^{ts}*) zeigt deutlich die starke Verzweigung von *myo5^{ts}*-Hyphen (C). Graue Kreise symbolisieren die Appressorien. Balken = 10 μm. Abbildung in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.2 Sind Chitinsynthasen ein „Cargo“ von Myo5?

Die Deletion von *myo5* in *U. maydis* führt zu gravierenden Störungen in der Morphogenese und der Zelltrennung haploider Sporidien, die die Bildung großer Zellaggregate zur Folge hat. $\Delta myo5$ -Zellen wachsen zudem deutlich langsamer als Wildtypzellen und sind signifikant dicker. Dieser Phänotyp legt nahe, dass von Myo5 transportierte Moleküle oder Organellen Funktionen in der Zelltrennung und im polaren Wachstum ausüben. Studien mit *Saccharomyces cerevisiae* lieferten starke Hinweise, dass das Klasse V Myosin Myo2p an der Lokalisation einer Chitinsynthase (Chs3p) beteiligt ist (Santos und Snyder, 1997). Vorversuche legten weiterhin nahe, dass eine ähnliche Situation auch in *U. maydis* vorliegt. Mittels eines kreuzreaktiven Antikörpers gegen Chs2p von *S. cerevisiae* (Sietsma et al., 1996) wurde gezeigt, dass die Chitinsynthasen-Verteilung in *myo5^{ts}*-Zellen nach Temperaturshift gestört ist (G. Steinberg, unveröffentlicht). In $\Delta myo5$ -Zellen konnte allerdings keine signifikante Fehlverteilung festgestellt werden (Weber et al., 2003). Ein weiteres Indiz für eine Interaktion resultierte aus der Behandlung der *myo5^{ts}*-Zellen mit dem Chitinase-Inhibitor Allosamidin. Durch Hemmung der Chitinasen in *myo5^{ts}*-Zellen konnten die charakteristischen Morphologieveränderungen deutlich verringert werden (G. Steinberg, unveröffentlicht).

2.2.1 *myo5^{ts}*-Zellen sind hypersensitiv gegenüber Nikkomycin Z

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuteten eine mögliche Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen an. Die Ergebnisse der Antikörperversuche waren jedoch teilweise widersprüchlich. Um dies zu klären, wurde als weiterer Versuch ein Sensitivitätstest gegenüber Nikkomycin Z vorgenommen.

Nikkomycin Z ist Struktur analog des UDP-N-Acetylglucosamins, dem Substrat der Chitinsynthasen, und inhibiert daher sehr spezifisch Chitinsynthasen (Cabib, 1991; Gaughran et al., 1994; Kim et al., 2002). In einem Agarplattentest wurden FB2Myo5^{ts}-Zellen und FB2-Zellen auf ihre Sensitivität gegenüber Nikkomycin Z bei permissiver Temperatur untersucht (vgl. Materialien und Methoden). Nach Inkubation bei 20°C zeigte sich nach einigen Tagen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutliche Hypersensitivität von FB2Myo5^{ts}-Zellen gegenüber 0,5 μ M Nikkomycin Z (Abb. 16). Bereits im ersten Verdünnungsschritt war ein reduziertes Wachstum von FB2Myo5^{ts}-Zellen zu beobachten.

Diese Hypersensitivität indizierte, dass die Chitinsynthese und/oder Chitinsynthase-Verteilung in FB2Myo5^{ts}-Zellen beeinträchtigt war. Dies basiert auf der Annahme, dass bei einem bereits vorliegenden Defekt in der Chitinsynthese und/oder Chitinsynthase-Verteilung, die spezifische Hemmung der Chitinsynthasen durch Nikkomycin Z zur Reduktion des Wachstums führen kann.

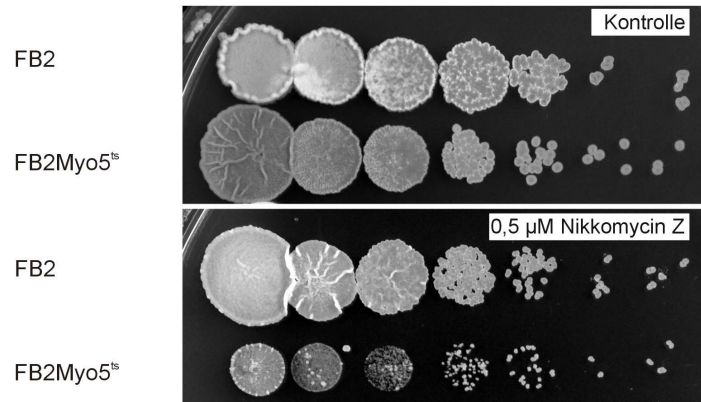


Abb. 16: Hypersensitivität von FB2Myo5^{ts} gegenüber Nikkomycin Z.

In einer Verdünnungsreihe wurde eine vergleichbare Anzahl von FB2- und FB2Myo5^{ts}-Zellen auf CM-Glucose-Agarplatten mit und ohne 0,5 µM Nikkomycin Z getropft. FB2Myo5^{ts}-Zellen zeigten auf Nikkomycin Z-haltigem Medium ein im Vergleich zu FB2-Zellen deutlich reduziertes Wachstum. Größere Kolonien von FB2Myo5^{ts} in den letzten Verdünnungsschritten gehen vermutlich auf Revertanten zurück.

Die erhöhte Sensitivität von *myo5^{ts}*-Zellen gegenüber Nikkomycin Z weist erneut auf eine Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen hin. Es wurde daher zur Identifikation dieser potentiellen „Cargos“ die genomische Sequenz von *U. maydis* (zunächst zur Verfügung gestellt von der Bayer CropScience Science AG, später auch durch das Whitehead Institut) nach Chitinsynthasen durchsucht.

2.2.2 Sequenzanalysen der *U. maydis* Chitinsynthasen

Es ist bekannt, dass die Anzahl der Chitinsynthasen in Pilzen variieren kann. Die genomische Sequenz der Hefe *S. cerevisiae* kodiert für drei Chitinsynthasen (Bulawa et al., 1986; Sburlati und Cabib, 1986; Valdivieso et al., 1991), während der filamentös wachsende Pilz *Aspergillus fumigatus* über sieben Chitinsynthasen verfügt (AfChsA – AfChsG) (Mellado et al., 1996a; Mellado et al., 1996b), www.proteome.com). Für *Ustilago maydis* waren zu Projektbeginn sechs Chitinsynthase-Sequenzen bekannt. Dabei handelte es sich um Sequenzfragmente von *chs1* (Accession-Number: M82958) und *chs2*

(Accession-Number M82959) (Bowen et al., 1992) sowie Sequenzen der Gene *chs3* (Accession-Number: X87748), *chs4* (Accession-Number: X87749), *chs5* (Accession-Number: AF030553) und *chs6* (Accession-Number: AF030554) (Xoconostle-Cazares et al., 1996; Xoconostle-Cazares et al., 1997). Ein Durchsuchen der genomischen Sequenz von *U. maydis* führte zu den entsprechenden Sequenzen von *chs1*, *chs3*, *chs4*, *chs5* und *chs6*. Das Gen *chs2* konnte in der damals zur Verfügung stehenden Sequenz, die nach Schätzungen nur ca. 83% des Genoms abdeckte (J. Kämper, pers. Mitteilung), nicht gefunden werden. Zusätzlich konnte eine weitere Chitinsynthase und eine Myosin-Chitinsynthase identifiziert werden. Diese Gene wurden *chs7* (für Chitinsynthase 7) und *mcs1* (für Myosin-Chitinsynthase 1) genannt.

Anhand dieser vorhandenen – nicht fehlerfreien – Sequenzen war es allerdings nicht möglich, die offenen Leserahmen von *chs7* und *mcs1* vorherzusagen. Aus diesem Grund wurde eine Cosmidbank verwendet (Weinzierl, 2001), um die Gene *chs7* und *mcs1* zu sequenzieren bzw. Subklone herzustellen (vgl. Materialien und Methoden). Um ebenfalls Sequenzen des offenen Leserahmens von *chs2* und der UTRs zu erhalten, wurde die Cosmidbank nach *chs2* durchsucht. Nach Isolation der Cosmide (F2F7F für *mcs1*, F2G1 und F11C9 für *chs2* und F11G4 für *chs7*) ergab die Sequenzierung drei durchgängige offene Leserahmen. *chs2* kodiert für ein 880 aa, *chs7* für ein 1273 aa und *mcs1* für ein 2005 aa großes Protein (Tabelle 2).

Tabelle 2: Sequenzdaten der Chitinsynthasen von *U. maydis*

Gen	Länge des ORFs	Protein-größe	Klasse	Anzahl der Transmembrandomänen*	Chitinsynthase-Kern**
<i>chs1</i>	2703 bp	900 aa	III	6, 7, 8, 9	213 - 538 aa
<i>chs2</i>	2643 bp	880 aa	I bzw. II	7, 9, 10	205 - 512 aa
<i>chs3</i>	3090 bp	940 aa	I	7, 9	285 - 601aa
<i>chs4</i>	2829 bp	942 aa	I	7, 8, 9	290 - 605 aa
<i>chs5</i>	4830 bp***	1609 aa			805 - 1145 aa
	(4560 bp)	(1519 aa)	IV	6, 8	(715 - 1055 aa)
	(4461 bp)	(1486 aa)			(682 - 1022 aa)
<i>chs6</i>	3543 bp	1180 aa	V	6, 7, 8	414 - 738 aa
<i>chs7</i>	3822 bp	1273 aa	IV	7, 8	465 - 797 aa
<i>mcs1</i>	6018 bp	2005 aa	V	6, 7, 9, 10	1272 – 1596 aa

* Aufgeführt ist die Anzahl der Transmembrandomänen, die von drei unterschiedlichen Programmen vorhergesagt wurde (SOSUI, HMMTOP, TMPRED vgl. Materialien und Methoden).

** Kernregion definiert nach einem Sequenzvergleich aller *U. maydis* Chitinsynthasen.

*** Startcodon konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Je nach gewähltem Startcodon variiert die Länge des ORFs von *chs5* und somit auch die des Proteins.

Die durchgeführten Sequenzanalysen zeigten, dass einige der veröffentlichten Chitinsynthase-Sequenzen fehlerhaft waren. Neben der Sequenzierung von genomischer DNA und cDNA wurden zusätzlich die 3'-Enden aller Chitinsynthasen (*chs1* bis *chs7* und *mcs1*) determiniert (vgl. Materialien und Methoden). Dabei stellte sich heraus, dass die 3'-Enden von *chs3*, *chs4*, *chs5* und *chs6* von den veröffentlichten Sequenzen abwichen. Zusätzlich zeigte sich, dass ab Basenpaar 1812 bzw. Aminosäure 605 der gesamte C-Terminus der veröffentlichten *chs4*-Sequenz (Chs4) keine Homologie zu der durch diese Analysen gewonnenen Chs4-Sequenz sowie zu anderen Chitinsynthasen gleicher Klasse aufwies. Ebenso ergab ein Vergleich mit der später durch das Whitehead Institut zur Verfügung gestellten genomischen Sequenz, dass auch die Sequenzen der veröffentlichten 5'-Enden von *chs3* und *chs4* vermutlich fehlerhaft sind. In Tabelle 2 sind die wichtigsten korrigierten Sequenzdaten zusammengefasst. Die Volllängensequenzen von *chs1*, *chs3*, *chs4*, *chs5* und *chs6* stammen von der durch das Whitehead Institut veröffentlichten genomischen Sequenz. Introns, die nicht zu einer Leserahmenverschiebung führen, können nicht ausgeschlossen werden. Die durch die Cosmidisolierungen erhaltenen Sequenzen von *mcs1*, *chs7* und *chs2* waren mit der Whitehead-Sequenz identisch und wurden ebenfalls für die durchgeführten Sequenzanalysen verwendet. Für die Vorhersage der Transmembrandomänen wurden drei unterschiedliche Programme eingesetzt, die in ihren Vorhersagen variierten (vgl. Materialien und Methoden). Die Kern-Region der Chitinsynthasen wurde anhand eines Sequenzvergleichs aller *U. maydis* Chitinsynthasen definiert und stimmte in etwa überein mit den anhand von ScChs2p definierten katalytischen Domänen con1 und con2 (Nagahashi et al., 1995; Yabe et al., 1998).

Sequenzvergleiche aller sieben Chitinsynthasen und der Myosin-Chitinsynthase von *U. maydis* mit anderen veröffentlichten Chitinsynthase-Sequenzen zeigten, dass diese Proteine unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden können (Abb. 17). So enthält das Genom von *U. maydis* zwei Klasse I (Chs3 und Chs4) und zwei Klasse IV (Chs5 und Chs7) Chitinsynthasen. Chs3 und Chs4 zeigten 47% Identität zueinander und liegen nur ca. 40 kb voneinander entfernt auf Chromosom I. Chs5 und Chs7 sind zu 29% identisch. Chs1 gruppiert mit Klasse III Chitinsynthasen, während Chs2 nicht eindeutig einer bestimmten Klasse zugeordnet werden konnte. Chs6 zeigt höchste Sequenzähnlichkeit zu anderen Chitinsynthasen der Klasse V, zu der bislang ausschließlich die Chitinsynthase-Domänen von Myosin-Chitinsynthasen gehören, so auch die C-terminale Chitinsynthase-Domäne von Mcs1 (Abb. 17).

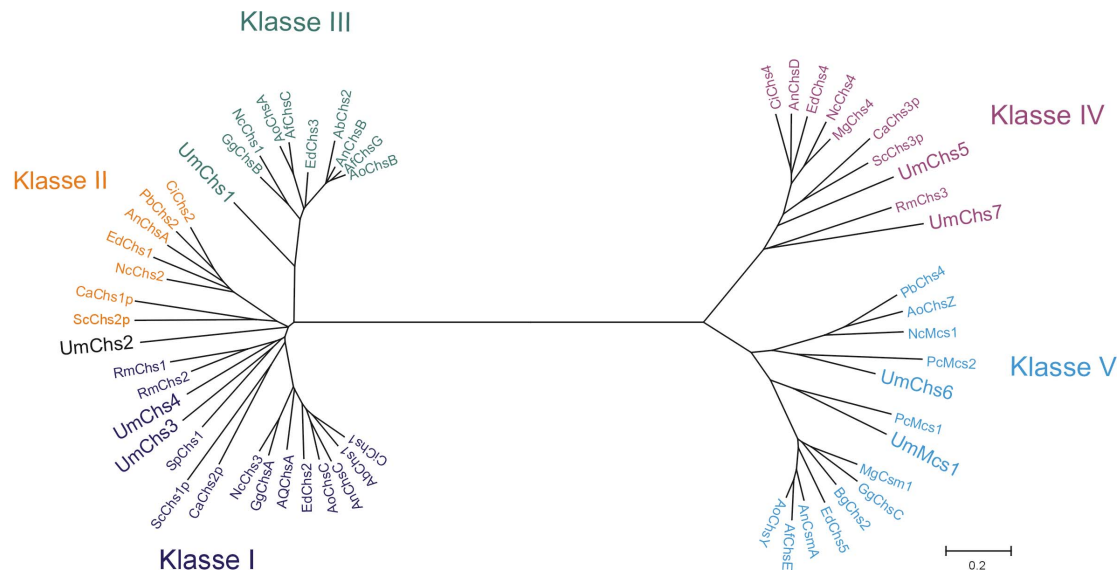


Abb. 17: Phylogenetischer Stammbaum bekannter Chitinsynthasen und der Chitinsynthase-Domänen der Myosin-Chitinsynthasen

Für Details der phylogenetischen Analyse siehe Materialien und Methoden. Balken = 0,2 Austausche pro Aminosäure. Die Zuordnung in die einzelnen Klassen erfolgte in Anlehnung an (Bowen et al., 1992; Nino-Vega et al., 2000; Munro und Gow, 2001; Mellado et al., 2003).

Ab: *Athroderna benhamiae*, Af: *Aspergillus fumigatus*, An: *Aspergillus nidulans*, Ao: *Aspergillus oryzae*, Aq: *Ampelomyces quisqualis*, Bg: *Blumeria graminis*, Ca: *Candida albicans*, Ci: *Coccidioides immitis*, Ed: *Exophiala dermatitidis*, Gg: *Glomerella graminicola*, Mg: *Magnaporthe grisea*, Nc: *Neurospora crassa*, Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*, Pc: *Phaenerochaete crysogenum*, Rm: *Rhizopus microsporus*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*. Accession-Numbers: AbChs1 (BAB17766), AbCh2 (AB055893.1), AfChsC (JC6015), AfChsE (P54267), AfChsG (X94244.1), AnChsA (D21268.1), AnChsB (JC2315), AnChsC (2102237A), AnChsD (JC6079), AnChsE (AB000125), AoChsA (AB073932.1), AoChsB (AY029261.1), AoChsC (AB073933), AoChsY (BAB88128), AoChsZ (BAB88127), AqChsA (AB073932), BgChs2 (AAF04279), CaChs1p (Q9URM1), CaChs2p (S20538), CaChs3p (P30573), CiChs1 (AF276826.1), CiChs2 (AF329357.1), CiChs4 (AY038603.1), EdChs1 (P30600), EdChs2 (AF052606), EdChs3 (AF053314.1), EdChs4 (AF126146.1), EdChs5 (AAL79830), GgChsA (AY052545.1), GgChsB (AY052546.1), GgChsC (AY052547), MgChs4 (O13353), MgChs5 (BAA74449), NcChs1 (1805248A), NcChs2 (X77782.1), NcChs3 (CAC28596), NcChs4 (Q01285), PbChs2 (Y09231.1), PbChs4 (AF107624), ScChs1p (A23944), ScChs2p (P14180), ScChs3p (P29465), SpChs1 (Z54308), RmChs1 (BAA01023), RmChs3 (T30202), RmChs2 (BAA01024). Sequenzen von PcMcs1 und PcMcs2 wurden der vom Doe Joint Genome Institut veröffentlichten Sequenz, die Sequenzen der Chitinsynthasen von *U. maydis* und von NcMcs1 der durch das Whitehead Institut veröffentlichten Sequenz entnommen. Für Chs5 wurde ein 1486 aa langes Protein verwendet (vgl. Materialien und Methoden). Die Sequenzen der Myosin-Chitinsynthasen wurden entsprechend verkürzt und nur die Sequenzen der Chitinsynthase-Domänen verwendet.

Der N-Terminus der Myosin-Chitinsynthase Mcs1 von *U. maydis* zeigt Homologie zu anderen Myosin-Motordomänen (Abb. 5 und Abb. 18) und enthält, ähnlich wie andere Myosine, einen „P-loop“ (vgl. 2.1.1). Auch in anderen Pilzen konnten diese Moleküle gefunden werden (Fujiwara et al., 1997; Park et al., 1999; Zhang und Gurr, 2000; Chigira et al., 2002; Amnuaykanjanasin und Epstein, 2003; Madrid et al., 2003).

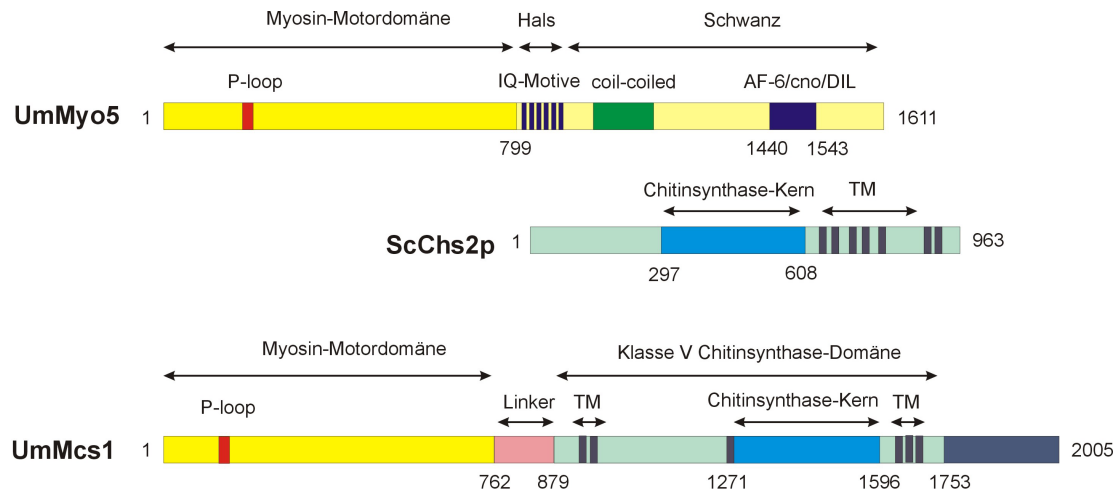


Abb. 18: Domänenstruktur von Mcs1 im Vergleich zu Myo5 und ScChs2p.

Mcs1 besteht im N-Terminus aus einer potentiellen Myosin-Motordomäne, an die sich nach einer Linkerregion eine Chitinsynthase-Domäne der Klasse V anschließt. TM = Transmembrandomänen (vorhergesagt durch HMMTOPmpred). Abbildung erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg.

Sie unterscheiden sich jedoch teilweise durch das Vorhandensein eines „P-loops“ (Nino-Vega et al., 2000; Chigira et al., 2002). Unklar ist bislang, ob Myosin-Chitinsynthasen Motoraktivität aufweisen. Um Hinweise auf die Funktionalität der Myosin-Motordomäne von Mcs1 zu gewinnen, wurden verschiedene Sequenzanalysen durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die Mcs1-Motordomäne Aminosäuren enthält, die sowohl in Klasse I, in Klasse II als auch in Klasse V Myosinen hochkonserviert sind. Es wurden Vertreter dieser Myosin-Klassen [Klasse I: DdIE (Q03479), AcIA (AF085185), AcIC (P10569), Klasse II: GgFSkE (P02565), DdMyoII (P08799), ScMyo1p (X53947), Klasse V: MmDilute (X57377), ScMyo2p (P19524), ScMyo4p (P32492)] verwendet, da nur diese Klassen in Pilzen vorhanden sind und für einige Myosine dieser Klassen bereits Motoraktivität bzw. Aktinbindung gezeigt werden konnte. Die Sequenzen der Motordomänen dieser ausgewählten Myosine wurden mit ClustalX verglichen und diejenigen Aminosäuren ermittelt, die in allen neun Motordomänen konserviert sind. 113 konservierte Aminosäuren wurden gefunden. Bei der anschließenden Durchsuchung der Motordomänensequenz von Mcs1 konnten aber nur 58 dieser 113 Aminosäuren (51,3%) wiedergefunden werden. Um auszuschließen, dass das geringe Vorhandensein konservierter Aminosäuren auf *U. maydis* spezifische Sequenzunterschiede zurückgeht, wurde die Sequenz von UmMyo5 nach den 113 Aminosäuren analysiert. Da 98,2% der konservierten Aminosäuren in der Motordomäne von UmMyo5 gefunden wurden, scheint

die Abweichung von Mcs1 molekülspezifisch zu sein. Die Mcs1-Motordomäne zeigt zu den oben aufgeführten Myosinen nur durchschnittlich 20,7% und zu UmMyo5 22% Sequenzidentität in der kompletten Motordomäne. Die für Myosine charakteristischen IQ-Motive, die an der Bindung leichter Ketten beteiligt sein sollen, konnten in Mcs1 nicht gefunden werden. Da die bislang bekannten Aktinbindungsregionen von Myosinen überwiegend durch Strukturmodelle definiert wurden (Smith und Rayment, 1996; Gulick et al., 1997; Houdusse et al., 1999), konnte durch Vergleiche mit diesen Myosinen aufgrund der schlechten Sequenzidentität keine eindeutige Aussage über eine mögliche Aktinbindung von Mcs1 getroffen werden. An der Nukleotidbindung scheinen in Myosinen die Motive „Switch I“ und „Switch II“ und der „Purin-Bindungsloop“ beteiligt zu sein (Kliche et al., 2001; Minehardt et al., 2002), die in veränderter Form auch in Mcs1 vorhanden sind. Die Konsensus-Sequenzen und die in Mcs1 vorhandenen Sequenzen sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3: Sequenzanalyse von Mcs1.

	Konsensus für Myosine	Mcs1
„P-loop“	GESGAGKT	GDTSSGKS
„Purin-Bindungsloop“	NP(X) ₆ Y*	NPYASSGNRN
„Switch I“	NXXSSR	NSNASR
„Switch II“	DXXGXE	DXXGFQ

* bei ScMyo2p, ScMyo4p und AclC: (X)₇

Die Sequenzanalysen zeigten, dass bestimmte Motive, die für die Myosin-Motoraktivität notwendig zu sein scheinen, in Mcs1 vorhanden sind. Da diese Sequenzen im Vergleich zum Konsensus Unterschiede aufweisen, könnte dies Einfluss auf die Aktivität der potentiellen Mcs1-Motordomänen haben.

2.2.3 Deletion der Chitinsynthasen und der Myosin-Chitinsynthase

Im Vordergrund dieser Arbeit stand vor allem die mögliche Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen in *U. maydis*. Einen Hinweis für diese Interaktion könnten Parallelen zwischen den Chitinsynthase-Deletionsphänotypen und dem Myo5-Deletionsphänotyp, insbesondere im Hinblick auf die Hypersensitivität von *myo5^{ts}*-Zellen gegenüber Nikkomycin Z, liefern. Zusätzlich können analoge Phänotypen der Chitinsynthase-Deletionsstämme untereinander ähnliche Funktionen der entsprechenden Moleküle andeuten. Von den veröffentlichten Chitinsynthase-Mutantenstämmen von *U. maydis* ist

bislang nur für *Δchs5*-Stämme eine reduzierte Pathogenität beschrieben worden (Gold und Kronstad, 1994; Xoconostle-Cazares et al., 1996; Xoconostle-Cazares et al., 1997). Morphologische Veränderungen waren von keinem der Mutantenstämme bekannt.

Zur phänotypischen Analyse der Chitinsynthase-Mutantenstämme wurden die veröffentlichten *Δchs1*-, *Δchs3*-, *Δchs4*-, *Δchs5*-Stämme bzw. das entsprechende Plasmid für die Deletion von *chs2* von den jeweiligen Arbeitsgruppen angefordert. Zusätzlich wurden auch die damals noch nicht veröffentlichten Deletionsstämme FB1*Δchs6* und FB2*Δchs6* mitgeliefert. Da die vorherigen Sequenzanalysen bereits fehlerhaft veröffentlichte Sequenzen von *chs3*, *chs4*, *chs5* und *chs6* ergaben, wurden zunächst alle erhaltenen Stämme mittels PCR und Southern-Analysen auf ihre Richtigkeit überprüft. Überraschenderweise ergab sich, dass nur in SG1 (*a2 b2Δchs1*, Gold und Kronstad, 1994), FB1*Δchs6* und FB2*Δchs6* (Garcerá-Teruel et al., 2004) das Gen erfolgreich deletiert war, während dies in den Deletionsstämmen von *chs3*, *chs4* und *chs5* nicht bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Aus diesem Grund war es notwendig, neue Deletionsmutanten von *chs3*, *chs4* und *chs5* herzustellen. Zusätzlich wurden auch *chs2* und die noch unveröffentlichten Chitinsynthasen *chs7* und *mcs1* deletiert. Dafür wurden die Plasmide pCRTPOChs3-KO-B, pCRTPOChs4-KO-H, pCRTPOChs5-KO-B, pCRTPOChs7-KO-H und pCRTPOMcs1-KO-H erstellt und in den Wildtypstamm FB2 transformiert. Mittels Ganz-Zell-PCR wurden Transformanten jedes Stammes auf das Vorliegen des entsprechenden Nullalleles durchmustert. Die erfolgreichen homologen Rekombination wurden sowohl durch PCR als auch durch Southern-Analysen bestätigt (nicht gezeigt). Dabei wurden unterschiedlichste Sonden verwendet, um sicher zu gehen, dass keine ORF-Fragmente mehr vorhanden waren. Die Gene *chs7* und *mcs1* wurden zusätzlich auch im Wildtypstamm FB1 und in SG200 deletiert.

2.2.3.1 *Δchs3*-, *Δchs4*-, *Δchs5*-, *Δchs6*-, *Δchs7*- und *Δmcs1*-Sporidien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die generierten *Δchs3*-, *Δchs4*-, *Δchs5*-, *Δchs6*-, *Δchs7*- und *Δmcs1*-Stämme zunächst morphologisch analysiert, wobei die Untersuchungen stets mit mindestens zwei unabhängigen Transformanten durchgeführt wurden. Die Phänotypen von *Δchs1*- und *Δchs2*-Zellen wurden nicht näher untersucht, da diese Stämme bereits veröffentlicht waren und die Überprüfung von SG1 (*a2 b2Δchs1*) klar ergab, dass es sich dabei um eine Nullmutante handelte.

Bei $\Delta chs3$ - und $\Delta chs4$ -Zellen konnten weder eine aberrante Zellmorphologie, noch Störungen in Bezug auf Wachstum und Zellteilung beobachtet werden (Abb. 19, A2 und A3). $\Delta chs6$ -Zellen zeigten hingegen eine seitliche Anschwellung, die auch bei $\Delta mcs1$ -Zellen – wenngleich in abgeschwächter Form – auftrat (Abb. 19, A4 und A5).

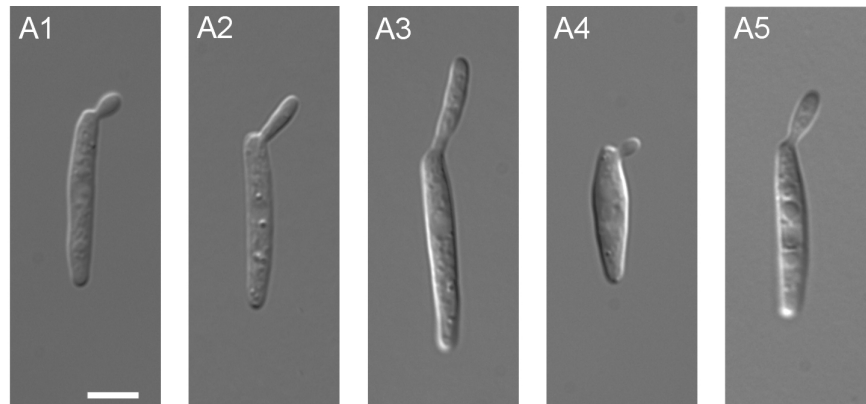


Abb. 19: Haploide Sporidien von FB2, FB2 $\Delta chs3$, FB2 $\Delta chs4$, FB2 $\Delta chs6$ und FB2 $\Delta mcs1$.

FB2 $\Delta chs3$ (A2) und FB2 $\Delta chs4$ (A3) zeigten im Vergleich zum Wildtyp FB2 (A1) keine Beeinträchtigung der Zellmorphologie. Deletion von *chs6* führte zum seitlichen Anschwellen der Zellen (A4). Auch FB2 $\Delta mcs1$ -Zellen zeigten einen größeren Zelldurchmesser (A5). Balken = 5 μ m.

Es stellte sich allerdings heraus, dass die Deletion von *chs5* – anders als veröffentlicht (Xoconostle-Cazares et al., 1997) – zu gravierenden morphologischen Veränderungen führte. $\Delta chs5$ -Zellen wiesen ähnlich wie $\Delta myo5$ -Zellen eine unregelmäßige Zellform und Zelltrennungsstörungen auf, was sich in der Bildung von Zellaggregaten äußerte (Abb. 20, A). Die Deletion der zweiten Klasse IV Chitinsynthase von *U. maydis*, *chs7*, resultierte ähnlich wie bei $\Delta chs5$ -Zellen in Zelltrennungsdefekten. Jedoch zeigten FB2 $\Delta chs7$ -Zellen eine regelmäßigere Zellform (Abb. 20, B).

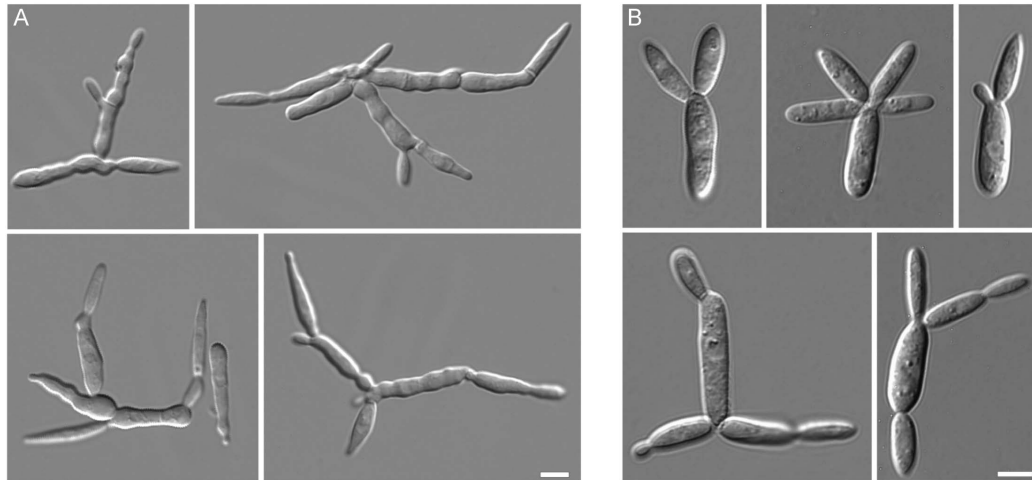


Abb. 20: Deletion der Klasse IV Chitinsynthasen, *chs5* (A) und *chs7* (B) in haploiden Sporidien.

FB2Δ*chs5*-Zellen zeigten eine unregelmäßige Zellform und Zelltrennungsdefekte, die zur Anhäufung großer Zellaggregate führten (A). Auch die Deletion von *chs7* resultierte in Zelltrennungsdefekten (B). Balken in A und B = 5 µm.

Zur Überprüfung, ob die Deletion von *chs3*, *chs4*, *chs5*, *chs6*, *chs7* und *mcs1* zu einer reduzierten Zellwandfestigkeit führt, wurden die Zellen osmotischem Stress ausgesetzt. Hierfür wurden die Zellen nach Wachstum eine Stunde in ddH₂O inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich bei keinem der untersuchten Deletionsstämme der Zelldurchmesser signifikant erhöhte. Es konnte jedoch bei den unbehandelten Kontrollen die Beobachtung bestätigt werden, dass die Stämme FB2Δ*chs4*, FB2Δ*chs6*, FB2Δ*chs7* und FB2Δ*mcs1* im Vergleich zum Kontrollstamm FB2 einen signifikant größeren Zelldurchmesser hatten (T-Test: FB2 ↔ FB2Δ*chs4* P : 0,0004; FB2 ↔ FB2Δ*chs6* P < 0,001; FB2 ↔ FB2Δ*chs7* P : 0,0066; FB2 ↔ FB2Δ*mcs1* P < 0,0001; n = 13-30 Zellen).

2.2.3.2 Δ*chs5*- und Δ*chs7*-Zellen zeigen eine gestörte Chitinverteilung

In mehreren Experimenten wurde die Chitinverteilung der Deletionsstämme FB2Δ*chs3*, FB2Δ*chs4*, FB2Δ*chs5*, FB2Δ*chs6*, FB2Δ*chs7* und FB2Δ*mcs1* sowie des Wildtypstamms FB2 mit Hilfe des Lektins WGA („wheat germ agglutinin“ = Weizenkeimagglutinin) untersucht. Lektine sind Proteine, die mit einer hohen Spezifität an Kohlenhydratreste in Glykoproteinen und anderen Biomolekülen binden. Die Synthese dieser Moleküle lässt sich daher mit Hilfe verschiedener fluorochromierter Lektine verfolgen. Für das Lektin WGA konnte eine sehr spezifische Bindung an N-Acetylglucosamin gezeigt werden (Nagata und Burger, 1974), und es diente daher für die Detektion von neusynthetisiertem Chitin.

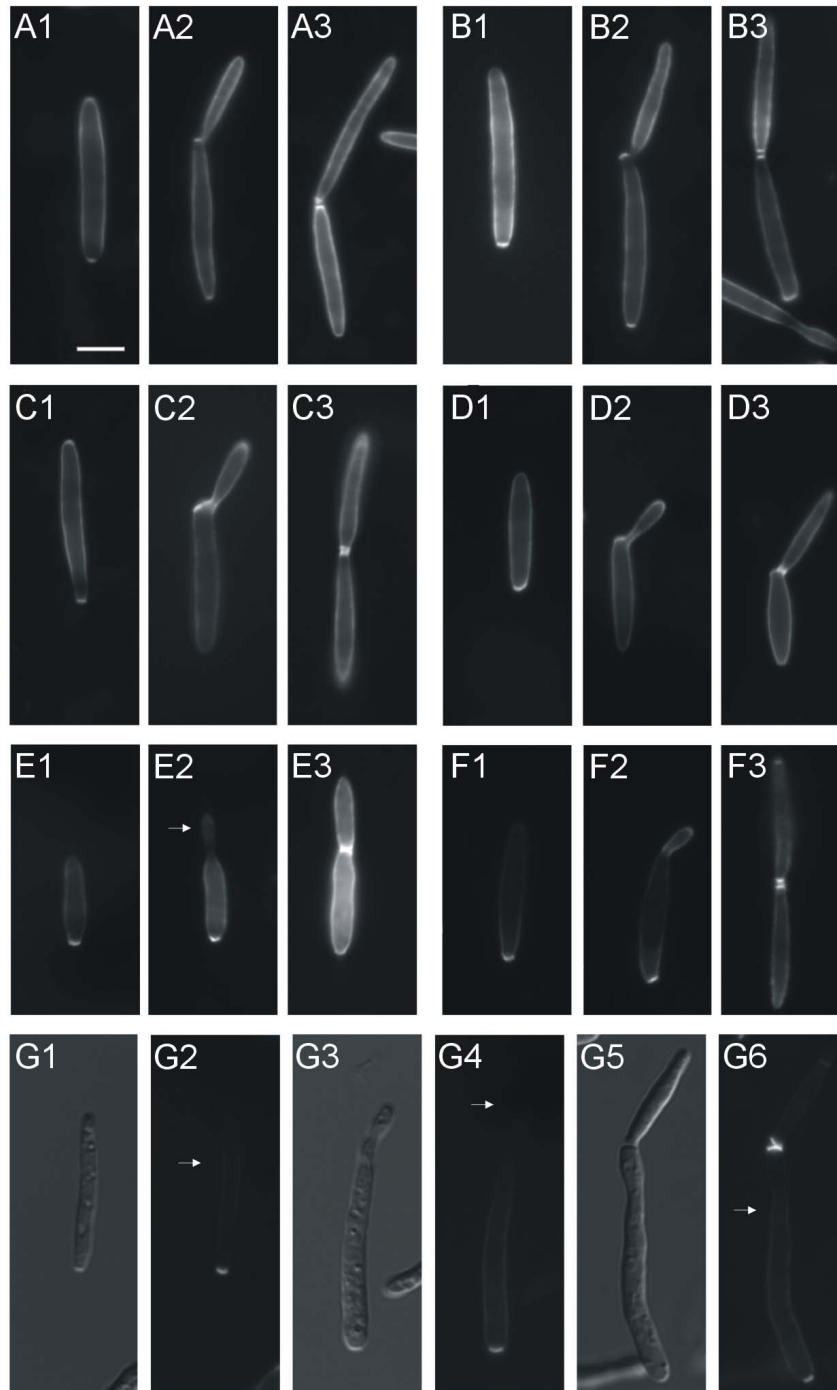


Abb. 21: Chitin-Färbung von FB2, FB2 Δ chs3, FB2 Δ chs4, FB2 Δ chs5, FB2 Δ chs6, FB2 Δ chs7 und FB2 Δ mcs1 durch WGA.

Δ chs3- (B1-B3), Δ chs4- (C1-C3), Δ chs6- (D1-D3) und Δ mcs1-Zellen (F1-F3) zeigten im Vergleich zu FB2-Wildtypzellen (A1-A3) keine abnormale Chitinverteilung. Kleine Knospen von Δ chs7-Zellen waren schwächer gefärbt (E1). In Δ chs5-Zellen wurden durch WGA nur die Knospungsarben und die Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle signifikant gefärbt (G1-G3). Balken = 5 μ m.

In diesen Experimenten zeigten FB2 Δ chs3, FB2 Δ chs4, FB2 Δ chs6 und FB2 Δ mcs1 im Vergleich zum Wildtyp FB2 keine auffälligen Veränderungen in der Verteilung von neu synthetisiertem Chitin. Die Knospen, der Knospenhals, die Knospungsnarbe und die Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle wurden deutlich stärker angefärbt als die Flanken der Zellen (Abb. 21, A-D und F). Der Stamm FB2 Δ chs7 zeigte hingegen im Vergleich zu FB2 eine deutlich schwächere Färbung der Knospen (Abb. 21, Pfeil in E2). In FB2 Δ chs5-Zellen konnten bei gleicher Einwirkzeit des Farbstoffs wie im Kontrollexperiment (Abb. 21, A) nur die Septen und die Knospungsnarben signifikant angefärbt werden (Abb. 21, G1-G6). Die Knospen und die Flanken der Zellen waren kaum sichtbar (Abb. 21, Pfeil in G2, G4, G6). Dies legt nahe, dass die Deletion von *chs7* und insbesondere von *chs5* zu einer veränderten Zellwandzusammensetzung führt.

2.2.3.3 Komplementation der FB2 Δ chs5 und FB2 Δ chs7 Phänotypen

Die Phänotypen von FB2 Δ chs5 und FB2 Δ chs7 konnten durch freireplizierende Plasmide, die die entsprechenden Gene trugen, komplementiert werden. Dazu wurden die Plasmide pNEBUH-Chs5 und pNEBUC-Chs7 kloniert und in FB2 Δ chs5 bzw. FB1 Δ chs7 und FB2 Δ chs7 transformiert. Diverse dieser FB2 Δ chs5-Transformanten zeigten unter Selektionsdruck Wildtypmorphologie, was auf eine Komplementation durch die zusätzliche Expression von *chs5* hindeutete (Abb. 22, A1). Transformanten, die nur das freireplizierende leere Ausgangsplasmid pNEBUH enthielten, zeigten den typischen Deletionsphänotyp (Abb. 22, A2).

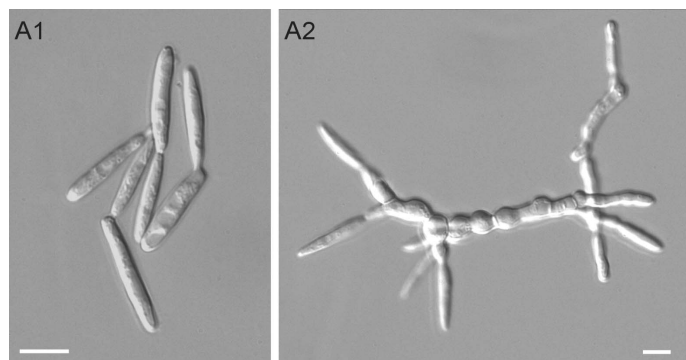


Abb. 22: Komplementation des *chs5*-Deletionsphänotyps.

Die Expression von *chs5* führte im Stamm FB2 Δ chs5 zur Rettung des Deletionsphänotyps (A1). Zellen, die nur das leere Ausgangsplasmid enthielten, zeigten die für die Mutante typischen Morphologie- und Zelltrennungsdefekte (A2). Balken in A1 und A2 = 5 μ m.

Analog dazu, konnten auch in FB1 Δ chs7- und FB2 Δ chs7-Stämmen die oben beschriebenen Zelltrennungsdefekte durch Expression von *chs7* auf einem freireplizierenden Vektor wieder aufgehoben werden (FB1 Δ chs7 pNEBUC-Chs7 und FB2 Δ chs7 pNEBUC-Chs7, Abb. 23, A1), wohingegen eine Komplementation durch das leere Ausgangsplasmid nicht stattfand (Abb. 23, A2). Die erfolgreiche Komplementation wurde auch im Kreuzungstest von FB1 Δ chs7 mit FB2 Δ chs7 pNEBUC-Chs7 beobachtet. Während in Kreuzungen kompatibler Δ chs7-Stämme eine stark reduzierte Filamentbildung auftrat, wurden in Kreuzungen von FB1 Δ chs7 mit FB2 Δ chs7 pNEBUC-Chs7 Filamente ausgebildet (Abb. 23, B).

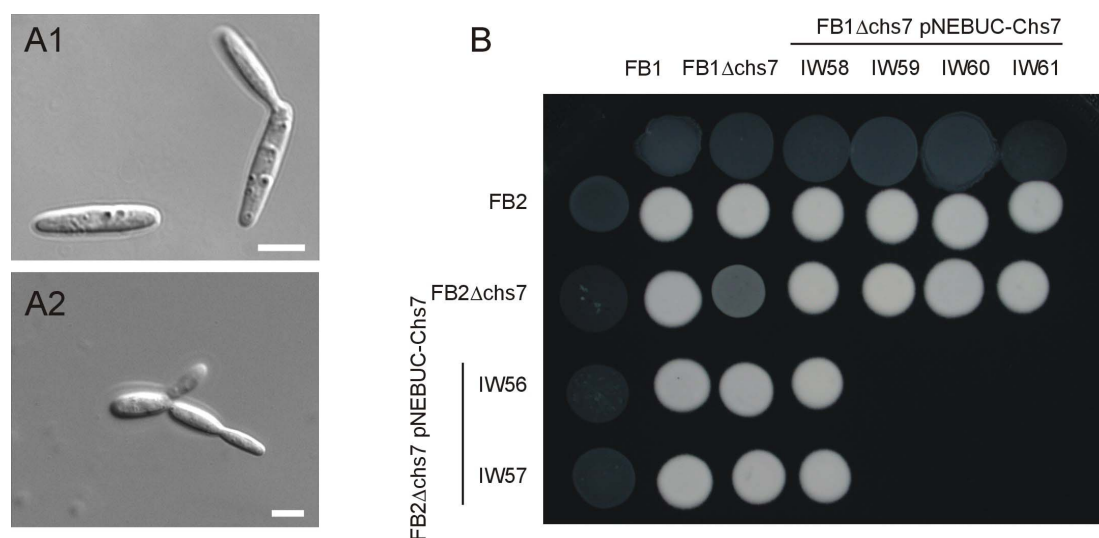


Abb. 23: Rettung des *chs7*-Deletionsphänotyps.

FB2 Δ chs7-Zellen, die das Plasmid pNEBUC-Chs7 trugen, zeigten eine normale Zellmorphologie (A1), während das leere Ausgangsplasmid pNEBUC keinen positiven Einfluss auf den Deletionsphänotyp hatte (A2). Auch die Filamentbildung war in Kreuzungen mit Δ chs7-Stämmen wieder hergestellt (B), während die Kreuzung kompatibler Δ chs7-Stämme zur reduzierten Filamentbildung führte (B). Balken in A1 und A2 = 5 μ m.

Dies bedeutet, dass sowohl der Δ chs7-Phänotyp als auch der Δ chs5-Phänotyp auf die Deletion der entsprechenden Gene (*chs7* und *chs5*) zurückgeht und nicht z. B. durch andere Mutationen hervorgerufen wurde. Aus den Stämmen FB2 Δ chs5 pNEBUH-Chs5 und FB2 Δ chs7 pNEBUC-Chs7 wurden die entsprechenden Plasmide (pNEBUH-Chs5 und pNEBUC-Chs7) isoliert und durch Restriktionsverdaue verifiziert.

Im Rahmen dieser Experimente wurde auch das aus dem Stamm FB2 Δ chs7 pNEBUC-Chs7 isolierte Plasmid pNEBUC-Chs7 in FB2 Δ chs5 transformiert, um Aussagen über eine mögliche Redundanz dieser beiden Klasse IV Chitinsynthasen treffen zu können. Eine Reduktion der Defekte von Δ chs5-Zellen konnte durch die zusätzliche *chs7*-Expression

allerdings nicht beobachtet werden. Dies deutet an, dass sich die Chitinsynthasen Chs5 und Chs7 in ihren Funktionen vermutlich gegenseitig nicht ersetzen können.

2.2.3.4 Konjugationshyphen- und Filamentbildung der Deletionsstämme

Ausgehend von dem nachgewiesenen Einfluss bestimmter Chitinsynthasen auf die Morphogenese haploider Sporidien (vgl. 2.2.3.1) wurde im weiteren untersucht, ob Chitinsynthasen, ähnlich wie Myo5, auch in anderen Entwicklungsprozessen eine signifikante Bedeutung zukommt. Zur Untersuchung des Kreuzungsverhaltens und der Fähigkeit, filamentös zu wachsen, wurden kompatible $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ -, $\Delta chs5$ -, $\Delta chs6$ -, $\Delta chs7$ - und $\Delta mcs1$ -Stämme auf aktivkohlehaltiges Medium getropft. Kreuzungen mit den entsprechenden Wildtypstämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6a (*a2 b1*) und FB6b (*a1 b2*) dienten als Kontrolle. Da zunächst alle *chs3*-, *chs4*- und *chs5*-Deletionsmutanten nur im FB2-Hintergrund (*a2 b2*) generiert wurden, wurden kompatible Nullmutanten durch jeweilige Kreuzung mit dem Wildtypstamm und nachfolgender Segregation erzeugt. Der „Matingtyp“ wurde durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1, FB2, FB6a und FB6b bestimmt. Die resultierenden kompatiblen Nullmutanten konnten nachfolgend sowohl für die Kreuzungstests als auch für die Pathogenitätstests eingesetzt werden. In Kreuzungstests auf PD-Charcoal-Platten erscheint das Dikaryon, das aus einer erfolgreichen Fusion zweier kompatibler Sporidien hervorgeht, als weißliches Mycel (Holliday, 1974). Kreuzungen kompatibler $\Delta chs3$ - und $\Delta chs4$ -Stämme waren wie die Kreuzung der Kontrollstämme FB1 und FB2 in ihrer Filamentbildung nicht beeinträchtigt (Abb. 24).

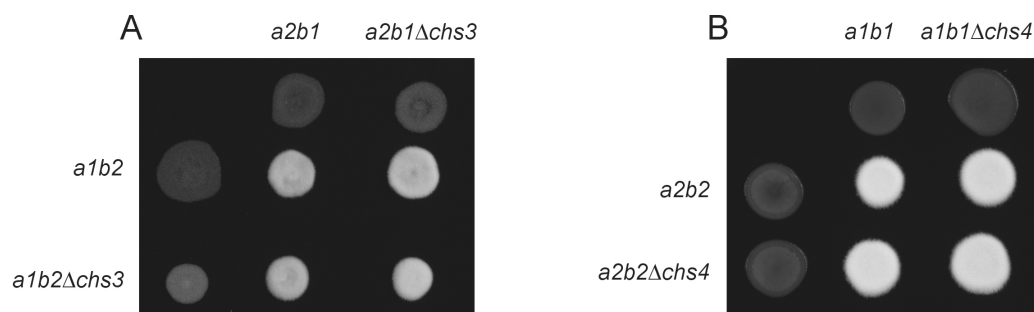


Abb. 24: Filamentbildung kompatibler $\Delta chs3$ - und $\Delta chs4$ -Stämme.

Kreuzungen kompatibler $\Delta chs3$ - (A) und $\Delta chs4$ -Stämme (B) sind nicht in der Filamentbildung gestört.

Bei kompatiblen $\Delta chs5$ - und $\Delta chs6$ -Stämmen trat eine verzögerte Filamentbildung auf. Erst nach zweitägiger Inkubation konnte ein weißliches Mycel beobachtet werden, das aber im Vergleich zu Wildtypkreuzungen schwächer ausgebildet war (Abb. 25).

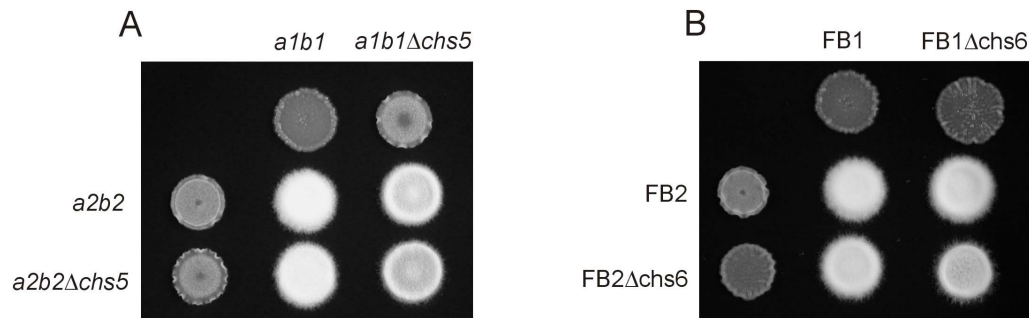


Abb. 25: Filamentbildung kompatibler $\Delta chs5$ - und $\Delta chs6$ -Stämme.

Nach eintägiger Inkubation der Kreuzungen kompatibler $\Delta chs5$ - (A) und $\Delta chs6$ -Stämme (B) war die Filamentbildung reduziert (nicht gezeigt), jedoch nach zwei Tagen mit der kompatibler Wildtypstämme vergleichbar.

Eine deutliche Reduktion der Filamentbildung wurde hingegen bei Kreuzungen kompatibler $\Delta chs7$ -Stämme beobachtet, was sich in gräulich erscheinenden Kolonien äußerte (Abb. 26, A). Dieser Defekt war nicht dominant, da Kreuzungen von $\Delta chs7$ -Zellen mit Wildtypzellen zur Bildung weißer Kolonien führten (Abb. 26, A).

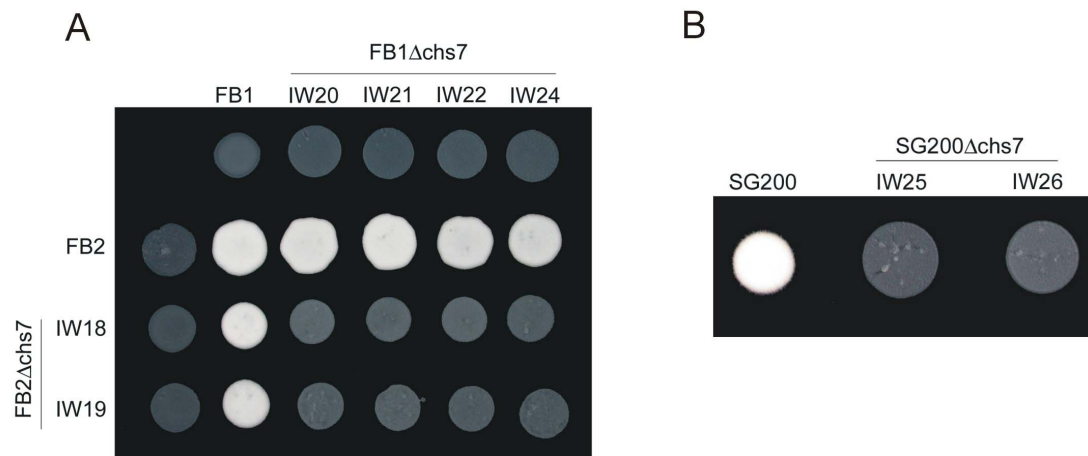


Abb. 26: Reduzierte Filamentbildung kompatibler $\Delta chs7$ -Stämme und SG200 $\Delta chs7$.

Auf aktivkohlehaltigen Agarplatten wuchsen gekreuzte compatible $\Delta chs7$ -Stämme (A) und der Stamm SG200 $\Delta chs7$ (B) nicht filamentös. Wildtypkreuzungen und SG200 bildeten hingegen die typischen „fuzzy“ Kolonien aus.

Die beobachtete reduzierte Filamentbildung kann sowohl auf Störungen in der Konjugationshyphenbildung als auch auf Defekte in Postfusionsprozessen zurückgehen. Um den Einfluss von *Chs7* auf Postfusionsprozesse zu untersuchen, wurde *chs7* in dem haploiden Stamm SG200 (*a1 mfa2 bE1 bW2*) deletiert. SG200 trägt neben einem aktiven *b*-Lokus (*bE1 bW2*) ein in den *a1*-Lokus inseriertes Pheromongen des *a2*-Lokus (*mfa2*) und ist daher zur autokrinen Pheromonstimulation befähigt (Bölker et al., 1995). Auf aktivkohlehaltigen Agarplatten wächst SG200 filamentös ohne vorherige Zellfusion. Untersuchungen mit dem Stamm SG200 ermöglichen daher die Differenzierung zwischen Defekten in der Konjugationshyphenbildung und Defekten des filamentösen Wachstums. Der Stamm SG200 Δ *chs7* war ähnlich wie die Kreuzung kompatibler Δ *chs7*-Zellen in der Filamentbildung gestört (Abb. 26, B). Dies zeigt, dass *Chs7* für das Wachstum der Hyphen von essentieller Bedeutung ist.

Des Weiteren wurde die Filamentbildung von Δ *mcs1*-Stämmen untersucht. Dafür wurden Kreuzungen kompatibler Stämme sowie der Stamm SG200 Δ *mcs1* auf aktivkohlehaltigem Medium untersucht. In keinem dieser Ansätze konnte eine reduzierte Filamentbildung beobachtet werden. Auch der Stamm SG200 Δ *mcs1*OGMcs1 (Abb. 27, vgl. 2.2.3.5), der durch Transformation des Plasmids pOGMcs1 in den Stamm SG200 Δ *mcs1* generiert wurde und die kodierende Sequenz eines GFP*Mcs1*-Fusionsproteins unter Kontrolle des *otef*-Promotors exprimiert (vgl. Materialien und Methoden), bildete weiße "fuzzy" Kolonien.

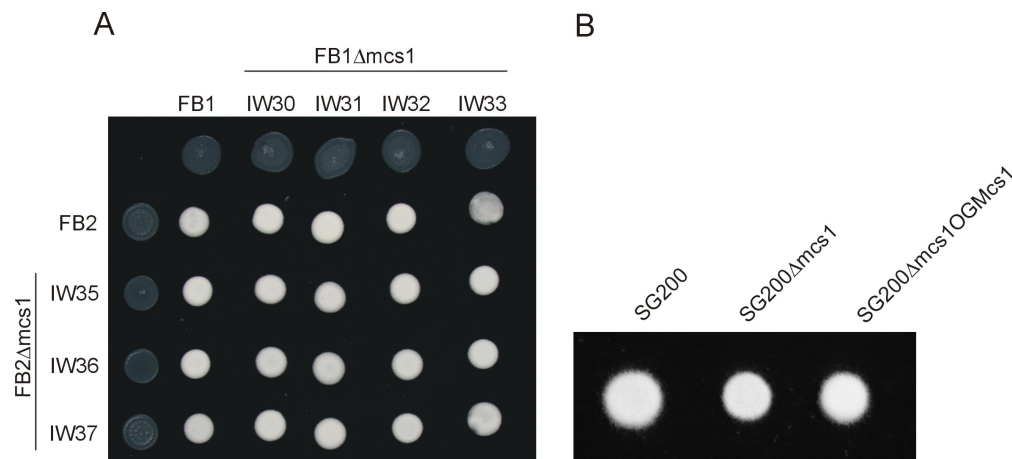


Abb. 27: Filamentbildung von kompatiblen Δ *mcs1*-Stämmen, von SG200 Δ *mcs1* und von SG200 Δ *mcs1*OGMcs1.

Gekreuzte compatible Δ *mcs1*-Stämme (A) und der Stamm SG200 Δ *mcs1* (B) waren in ihrer Filamentbildung nicht beeinträchtigt. Die Expression von GFP*Mcs1* unter Kontrolle des *otef*-Promotors in SG200 Δ *mcs1* (SG200 Δ *mcs1*OGMcs1) hatte keinen negativen Einfluss auf die Filamentbildung.

Die für $\Delta chs5$ - und $\Delta chs6$ -Zellen beobachtete verlangsamte bzw. reduzierte Filamentbildung konnte verschiedene Ursachen haben. Um in diesem Zusammenhang zwischen Problemen in der Konjugationshyphenbildung und im filamentösen Wachstum unterscheiden zu können, wurden FB2 $\Delta chs5$ und FB2 $\Delta chs6$ mit synthetischem a1-Pheromon für 11 h bei 20°C stimuliert. Auch FB2 $\Delta chs7$ -Zellen wurden stimuliert, um herauszufinden, ob neben dem gestörten Hyphenwachstum zusätzlich Defekte in der Konjugationshyphenbildung für die reduzierte Filamentbildung verantwortlich sind.

Nach Stimulation mit synthetischem Pheromon bildeten $67,6 \pm 10,2\%$ der Wildtypzellen Konjugationshyphen aus ($n = 205$, drei unabhängige Experimente), während bei FB2 $\Delta chs5$ nur $2,4 \pm 0,8\%$ ($n = 157$, zwei unabhängige Experimente), bei FB2 $\Delta chs6$ nur $22,5\%$ ($n = 71$) und bei FB2 $\Delta chs7$ nur $5,1 \pm 4,4\%$ der Zellen ($n = 199$, drei unabhängige Experimente) hyphenartige Strukturen zeigten (Abb. 28). Diese Strukturen waren bei FB2 $\Delta chs7$ mit $23,4 \pm 6,1 \mu m$ ($n = 5$) signifikant kürzer als vergleichbare Wildtyphyphen ($53,8 \pm 15,5 \mu m$, $n = 12$, T-Test $P < 0.0001$).

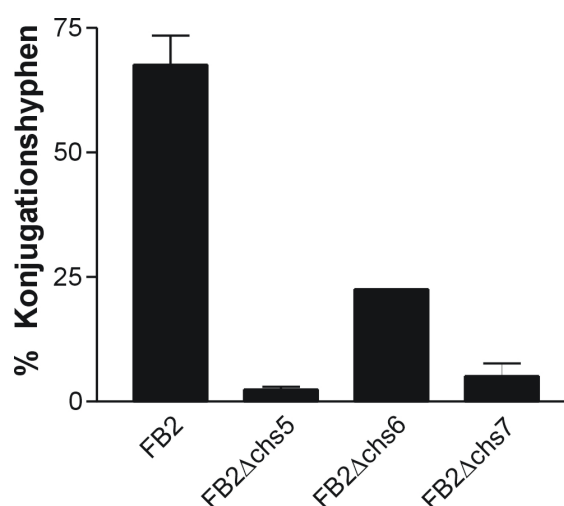


Abb. 28: Konjugationshyphenbildung von FB2, FB2 $\Delta chs5$, FB2 $\Delta chs6$ und FB2 $\Delta chs7$. Nach Stimulation mit synthetischem a1-Pheromon bildeten $67,6 \pm 10,2\%$ der FB2-Wildtypzellen Konjugationshyphen aus. FB2 $\Delta chs5$, FB2 $\Delta chs6$ und FB2 $\Delta chs7$ waren in der Ausbildung von Konjugationshyphen deutlich reduziert. Bei FB2 $\Delta chs5$ bildeten nur $2,4 \pm 0,8\%$, bei FB2 $\Delta chs6$ nur $22,5\%$ und bei FB2 $\Delta chs7$ nur $5,1 \pm 4,4\%$ der Zellen filamentöse Strukturen aus.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass Chs7 sowohl an der Konjugationshyphenbildung als auch an Postfusionsprozessen beteiligt ist. Die verlangsamte Filamentbildung von $\Delta chs5$ -Zellen und $\Delta chs6$ -Zellen hat ihre Ursache in einer stark reduzierten Ausbildung von Konjugationshyphen und somit sind Chs5, Chs6 und Chs7 – ähnlich wie Myo5 – für die Konjugationshyphenbildung von großer Bedeutung.

2.2.3.5 Deletion von *chs6*, *chs7* und *mcs1* führt zu Pathogenitätsverlust

Myo5 ist essentiell für die erfolgreiche Pathogenität von *U. maydis* (vgl. 2.1.6). Zur Untersuchung ob auch die Deletion der Chitinsynthasen, den möglichen „Cargos“ von Myo5, einen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis* hat, wurden kompatible Deletionsstämme und die entsprechenden Wildtypstämme FB1 und FB2 durch Spritzinfektion in sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam inokuliert und im Gewächshaus inkubiert.

In zwei unabhängigen Infektionsversuchen zeigten Pflanzen, die mit kompatiblen $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ - und $\Delta chs5$ -Stämmen infiziert wurden, eine leicht reduzierte Tumorbildung. Statt durchschnittlich 86,8% in einer Wildtypinfektion bildeten bei Infektion kompatibler $\Delta chs3$ -Stämme nur 60%, im Fall von $\Delta chs4$ -Stämmen nur 67% und im Fall von $\Delta chs5$ -Stämmen nur 75,3% der Pflanzen Tumore aus (Tabelle 4). Tumore, die aus einer Infektion mit $\Delta chs4$ -Zellen resultierten, waren im Vergleich zu Tumoren, die bei Wildtypinfektionen gebildet wurden, deutlich kleiner (nicht gezeigt).

Tabelle 4: Analyse der Pathogenität von *chs3*-, *chs4*- und *chs5*-Deletionsmutanten.

Inokulum	Anthocyanbildung	Tumore	Anzahl infizierter Pflanzen
wt (FB1 x FB2)	98,9%	86,8%	91
$\Delta chs3$ (IW 101 x IW 102)	94,5%	60%	75
$\Delta chs4$ (IW 84 x IW85)	97,6%	67%	82
$\Delta chs5$ (IW 89 x FB2 $\Delta chs5$)	96,1%	75,3%	77

Diese Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen.

Die Deletion von *chs6* führte zu einem kompletten Pathogenitätsverlust der Zellen (Tabelle 5). Auch konnte keine Anthocyanbildung bei mit $\Delta chs6$ -Zellen infizierten Pflanzen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Defekte der *chs6*-Deletionsmutanten ein Eindringen in die Pflanze verhinderten.

Tabelle 5: Analyse der Pathogenität von *chs6*-Deletionsmutanten.

Inokulum	Anthocyanbildung	Tumore	Anzahl infizierter Pflanzen
FB1 x FB2	98,6%	87,7%	73
FB1 $\Delta chs6$ x FB2 $\Delta chs6$	0%	2,8%*	72

* Es handelte sich hier um zwei tote Pflanzen, wobei der Pflanzentod auch auf andere, pilzunabhängige Ursachen zurückgehen könnte.

Diese Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen.

Kompatible $\Delta chs7$ -Stämme waren in ihrer Pathogenität stark reduziert, was vermutlich auf die gestörte Konjugationshyphen- und Filamentbildung zurückzuführen ist (vgl. 2.2.3.4). In zwei unabhängigen Experimenten bildeten nur 1,7% der Pflanzen Anthocyan und nur 3,4% der Pflanzen Tumore aus (Tabelle 6). Im Gegensatz zu Infektionen mit kompatiblen $chs7$ -Deletionsstämmen reduzierte sich die Anthocyan- und Tumorbildung bei Infektion mit dem solopathogenen Stamm SG200 $\Delta chs7$ nur auf 45% bzw. 30%. Die gebildeten Tumore waren deutlich kleiner als bei Pflanzen, die mit SG200 infiziert wurden (Abb. 29). Folglich kann der Verlust der Pathogenität nicht ausschließlich auf Fusionsdefekte zurückgehen. Vielmehr lässt die Tatsache, dass der Stamm SG200 $\Delta chs7$ im Vergleich zur Kontrolle weniger Tumore induzierte, vermuten, dass zusätzliche Defekte im Hyphenwachstum inner- und außerhalb der Pflanzen vorliegen müssen (vgl. auch 2.2.3.4).

Tabelle 6: Analyse der Pathogenität von $chs7$ -Deletionsmutanten.

Inokulum	Anthocyanbildung	Tumore	Anzahl infizierter Pflanzen
FB1 x FB2*	96,7%	78,7%	61
FB1 $\Delta chs7$ x FB2 $\Delta chs7$ *	1,7%	3,4%	58
SG200	95,5%	86,4%	22
SG200 $\Delta chs7$	45%	30%	20

*Diese Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen.

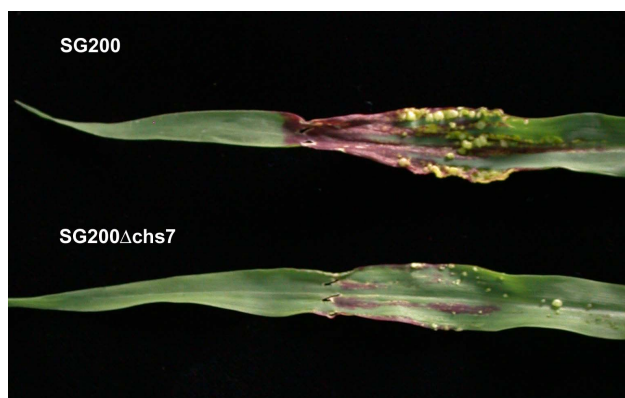


Abb. 29: Tumorbildung von SG200 und SG200 $\Delta chs7$.

Pflanzen, die mit SG200 $\Delta chs7$ infiziert wurden, bildeten deutlich kleinere Tumore aus als Pflanzen, die mit SG200 infiziert wurden.

$\Delta mcs1$ -Stämme und SG200 $\Delta mcs1$ waren in der Filamentbildung auf aktivkohlehaltigen Platten nicht gestört (vgl. 2.2.3.4). So war es überraschend, dass die Deletion von $mcs1$ in kompatiblen Stämmen sowie im solopathogenen Stamm SG200 $\Delta mcs1$ zu einer vollständigen Apathogenität führte (Abb. 30 und Tabelle 7). Weder Anthocyan- noch Tumorbildung konnte beobachtet werden, was andeutet, dass der Pilz nicht in die Pflanze

eingedrungen ist. Daher ist anzunehmen, dass die durch die Deletion verursachten Defekte vermutlich erst auf der Pflanzenoberfläche auftraten und so ein Eindringen in die Pflanze verhinderten. Um zu zeigen, dass der Pathogenitätsverlust von SG200 Δ mcs1 tatsächlich auf die Deletion von *mcs1* zurückgeht, wurde das Plasmid pOGMcs1 kloniert und in das Genom von SG200 Δ mcs1 integriert (SG200 Δ mcs1OGMcs1).

Tabelle 7: Analyse der Pathogenität von *mcs1*-Deletionsmutanten.

Inokulum	Anthocyanbildung	Tumore	Anzahl infizierter Pflanzen
FB1 x FB2*	96,7%	77%	61
FB1 Δ mcs1 x FB2 Δ mcs1*	0%	0%	63
SG200**	8,7%	56,5%	46
SG200 Δ mcs1**	0%	0%	43
SG200 Δ mcs1OGMcs1**	8,5%	38,8%	47

*Die Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen.

**Diese Infektionsversuche wurden im Dezember 2003 durchgeführt. Vermutlich jahreszeitlich bedingt wurde auch in Kontrollinfektionen kaum Anthocyan- und eine reduzierte Tumorbildung beobachtet. Generelle Tendenzen sind dennoch erkennbar.



Abb. 30: Mit kompatiblen Wildtypstämmen und Δ mcs1-Stämmen infizierte Pflanzen.

Pflanzen, die mit kompatiblen Δ mcs1-Stämmen infiziert wurden, zeigten keine Infektionssymptome. Die Bilder wurden acht Tage nach Infektion aufgenommen. Auch 20 Tage nach Infektion konnten keine Symptome beobachtet werden.

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz des *mcs1* Gens fusioniert an den C-Terminus der kodierenden Sequenz des GFPs unter Kontrolle des *otef*-Promotors und ermöglicht die konstitutive Expression eines GFP*Mcs1*-Fusionsproteins. Der resultierende Stamm SG200Δ*mcs1*OG*Mcs1* wuchs normal und zeigte keine Störungen in der Morphologie und Filamentbildung auf aktivkohlehaltigen Platten (vgl. Abb. 27). Durch Expression von GFP*Mcs1* in SG200Δ*mcs1* war die Pathogenität wiederhergestellt (Tabelle 7), was deutlich zeigt, dass *Mcs1* für die Pathogenität von *U. maydis* von essentieller Bedeutung ist. Die in dieser Infektionsstudie auch bei Infektionen mit dem Kontrollstamm SG200 aufgetretene geringere Anthocyan- und Tumorbildung war vermutlich jahreszeitlich bedingt. Die ebenfalls reduzierte Pathogenität von Δ*chs7*- und Δ*chs6*-Zellen deutet eine wichtige Funktion der Chitinsynthasen während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* an und zeigt somit Parallelen zu Myo5 auf.

2.2.3.6 Einige Chitinsynthase-Mutanten zeigen Nikkomycin Z-Hypersensitivität

Eine Behandlung haploider Sporidien mit den Chitinsynthase-Inhibitoren Polyoxin D und Nikkomycin Z führt zu unterschiedlichen morphologischen Veränderungen. Während nach Polyoxin D-Behandlung die Zellen an den Flanken anschwellen, führt Nikkomycin Z zu einer lokalen Aufweichung der Zellwand in der Knospenspitze und somit zu einer Rundung (G. Steinberg, pers. Mitteilung). Dies deutet an, dass durch die beiden Substanzen unterschiedliche Chitinsynthasen inhibiert werden und dass diese gehemmten Chitinsynthasen unterschiedlich lokalisiert sind. Dabei scheint Nikkomycin Z vorherrschend polar lokalisierende Chitinsynthasen zu hemmen, da in behandelten Zellen fast ausschließlich Zellwandbereiche der Knospenspitze beeinträchtigt sind. Die vollständige Hemmung einer einzelnen Chitinsynthase durch Nikkomycin Z ist auszuschließen, da keine der untersuchten Deletionsmutanten einen ähnlichen Phänotyp hatte (vgl. 2.2.3.1). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *myo5^{ts}*-Zellen eine deutliche Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z aufweisen, was auf eine Störungen der Chitinsynthese hinweist (vgl. 2.2.1). Um weitere Hinweise über eine Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen zu gewinnen und um in Verbindung mit den *in vivo* Lokalisationsdaten der Chitinsynthasen (vgl. 2.2.4) eine Aussage über eine mögliche Redundanz dieser Enzyme treffen zu können, wurde die Sensitivität der Deletionsstämme gegenüber Nikkomycin Z in mehreren unabhängigen Experimenten überprüft. Verdünnungsreihen des Wildtypstamms FB2 und der Deletionsstämme wurden auf CM-

Glucose-Agarplatten getropft, welche 1,0 μ M Nikkomycin Z enthielten. Nach erfolgter Inkubation bei 28°C zeigte sich folgendes Ergebnis:

Im Vergleich zu FB2 zeigten die Stämme SG1 (*a2 b2 Δ chs1*) und FB2 Δ chs6 eine extrem hohe Sensitivität. Auch die Stämme FB2 Δ chs5, FB2 Δ chs7 und FB2 Δ mcs1 waren deutlich sensibler gegenüber Nikkomycin Z als der Wildtypstamm FB2, während die Deletionen von *chs2*, *chs3* und *chs4* zu keiner Hypersensitivität führten (Abb. 31). Die Hypersensitivität der genannten Deletionsstämme deutet an, dass durch den Inhibitor Nikkomycin Z Chitinsynthesen gehemmt wurden, die Funktionen des deletierten Enzyms zumindest teilweise übernommen hatten bzw. den Verlust kompensieren konnten.

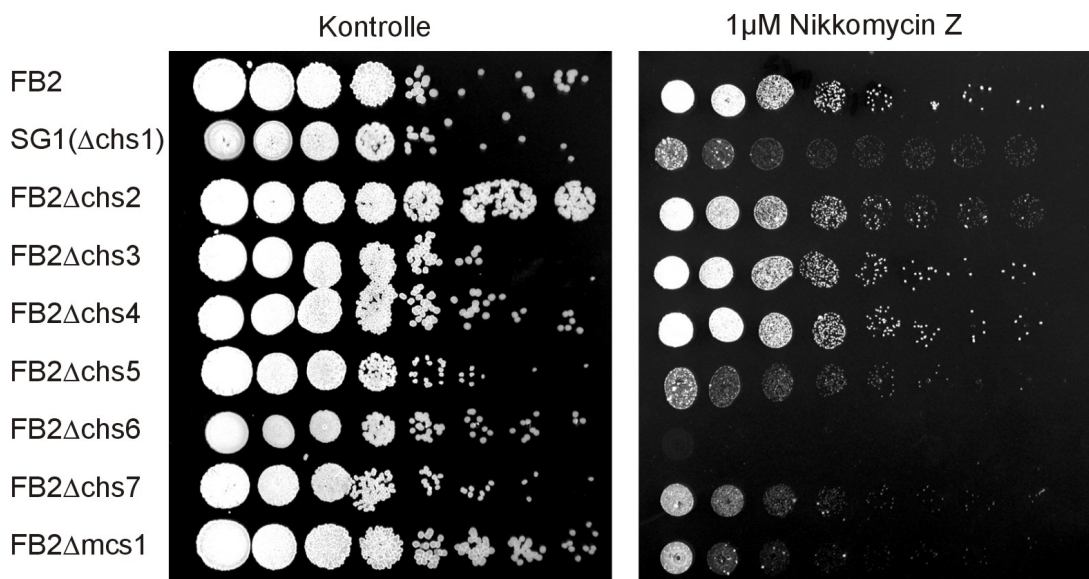


Abb. 31: Sensitivität von FB2 und der Chitinsynthase-Deletionsstämme gegenüber Nikkomycin Z.

Die Stämme SG1, FB2 Δ chs5, FB2 Δ chs6, FB2 Δ chs7 und FB2 Δ mcs1 waren hypersensitiv gegenüber 1 μ M Nikkomycin Z. Dabei war insbesondere das Wachstum von FB2 Δ chs6 stark inhibiert.

Die erhöhte Sensitivität der Stämme FB2 Δ chs1, FB2 Δ chs5, FB2 Δ chs6, FB2 Δ chs7 und FB2 Δ mcs1 gegenüber einem Inhibitor, der überwiegend in der Knospenspitze lokalisierende Chitinsynthesen zu hemmen scheint, legt zudem eine polare Lokalisation von Chs1, Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 nahe. Da von Myo5 ebenfalls eine polare Lokalisation bekannt ist (Weber et al., 2003) und auch für *myo5^{ts}*-Mutanten eine Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z nachgewiesen werden konnte (vgl. 2.2), liefern diese Versuche deutliche Anzeichen für einen Zusammenhang zwischen Myo5 und Chitinsynthesen.

2.2.4 *in vivo* Lokalisation der Chitinsynthase-Fusionsproteine

2.2.4.1 Lokalisation der Chitinsynthasen in Sporidien, Konjugationshyphen und Filamenten

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellte Hypersensitivität ließ eine polare Lokalisation von Chs1, Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 vermuten. Daher wurden GFP bzw. YFP-Fusionsproteine aller Chitinsynthasen für eine *in vivo* Lokalisation hergestellt. Dafür wurden zunächst die 3'-Enden der Gene determiniert und die Plasmide pSLB-Chs1-GFP-hom, pSLB-Chs2-GFP-hom, pSLB-Chs3-GFP-hom, pSLB-Chs4-GFP-hom, pSLB-Chs5-GFP-hom, pSLB-Chs6-GFP-hom, pSLB-Chs7-YFP-hom, pSLB-Mcs1-YFP-hom kloniert. Diese Plasmide wurden homolog in die entsprechenden Loci des Wildtypstamms FB2 integriert. Die erfolgreichen homologen Rekombinationen wurden durch Southern-Analysen bestätigt (nicht gezeigt) und führten zu der Expression C-terminaler mit GFP bzw. YFP fusionierter Chitinsynthasen unter Kontrolle der endogenen Promotoren. Keiner der resultierenden Stämme FB2Chs1GFP, FB2Chs2GFP, FB2Chs3GFP, FB2Chs4GFP, FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP zeigte im Vergleich zum Wildtyp morphologische Veränderungen.

In keinem Zellzyklusstadium konnte in den Stämmen FB2Chs1GFP und FB2Chs2GFP eine spezifische Lokalisation der GFP-Fusionsproteine beobachtet werden (nicht gezeigt). Alle übrigen Fusionsproteine zeigten eine Lokalisation in den Septen haploider Sporidien zwischen Mutter- und Tochterzelle (Abb. 32 bis Abb. 36). Für Chs3GFP und Chs4GFP konnten keine weiteren spezifischen Lokalisationen gefunden werden. Die in den Zellen in Abb. 32 zu erkennenden gefärbten cytoplasmatischen Strukturen stellen höchstwahrscheinlich Mitochondrien dar (G. Steinberg, pers. Mitteilung) und konnten bei gleicher Belichtung und Skalierung auch in Wildtypzellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Stämme FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP zeigten zusätzlich deutliche Signale in den Spitzen kleiner und mittlerer Knospen (Abb. 33 bis Abb. 36). Insbesondere Chs5GFP, Chs6GFP und Mcs1YFP waren kappenartig und membranständig in der Knospenspitze verteilt.

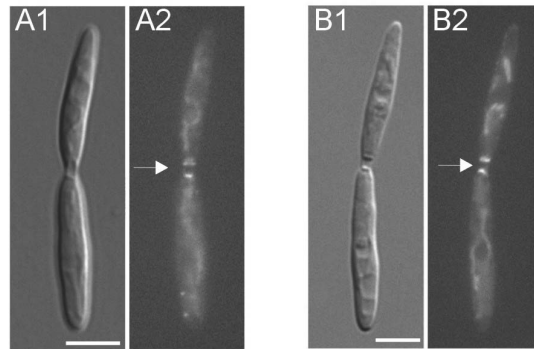


Abb. 32: Lokalisation von Chs3GFP und Chs4GFP in haploiden Sporidien.

Chs3GFP (A1 und Pfeil in A2) und Chs4GFP (B1 und Pfeil in B2) lokalisierten ausschließlich an Septen haploider Sporidien. Balken = 5 μm .

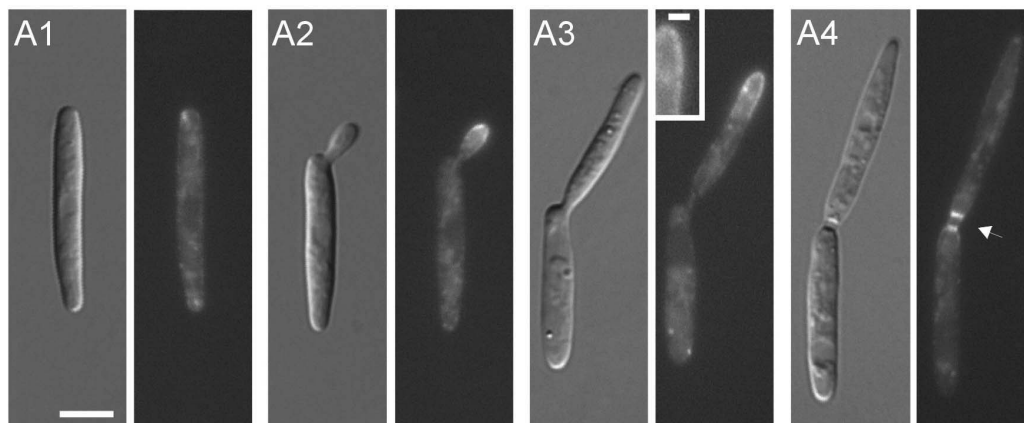


Abb. 33: Lokalisation von Chs5GFP in haploiden Sporidien.

Chs5GFP war in Zellen ohne Knospe gleichmäßig verteilt (A1). In wachsenden Knospen lokalisierte es membranständig in der Spitze (A2 und A3). Chs5GFP befand sich auch in Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle (Pfeil in A4). Balken in A1 = 5 μm , Balken im Vergrößerungsfenster = 1 μm .

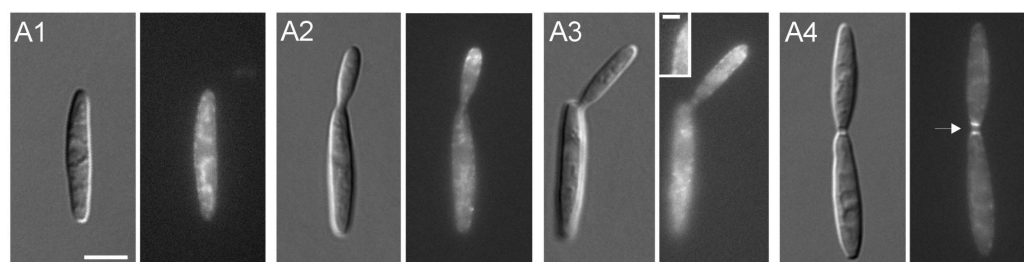


Abb. 34: Lokalisation von Chs6GFP in haploiden Sporidien.

Zellen ohne Knospe zeigten eine schwache Chs6GFP Lokalisation in der Membran (A1). Chs6GFP akkumulierte in Zellen mit kleiner und mittlerer Knospe in der Spitze (A2 und A3) und lokalisierte zudem an Septen (Pfeil in A4). Balken in A1 = 5 μm , Balken im Vergrößerungsfenster = 1 μm .

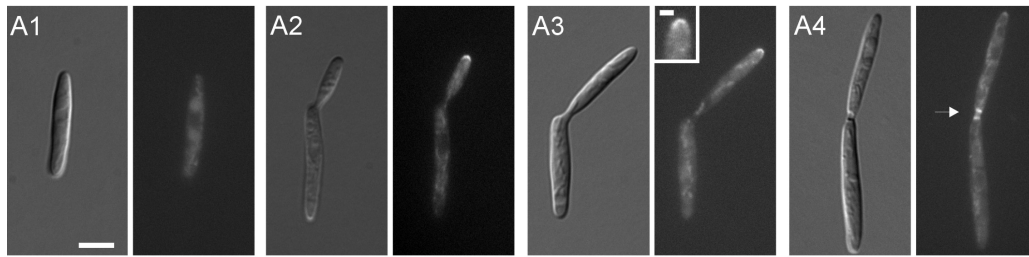


Abb. 35: Lokalisation von Chs7YFP in haploiden Sporidien.

Chs7YFP war gleichmäßig im Cytoplasma nicht knospender Zellen verteilt (A1). In kleinen und mittleren Knospen konnte Chs7YFP in der Knospenspitze beobachtet werden (A2 und A3). Chs7YFP-Signale zeigten sich auch in Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle (Pfeil in A4). Balken in A1 = 5 μ m, Balken im Vergrößerungsfenster = 1 μ m.

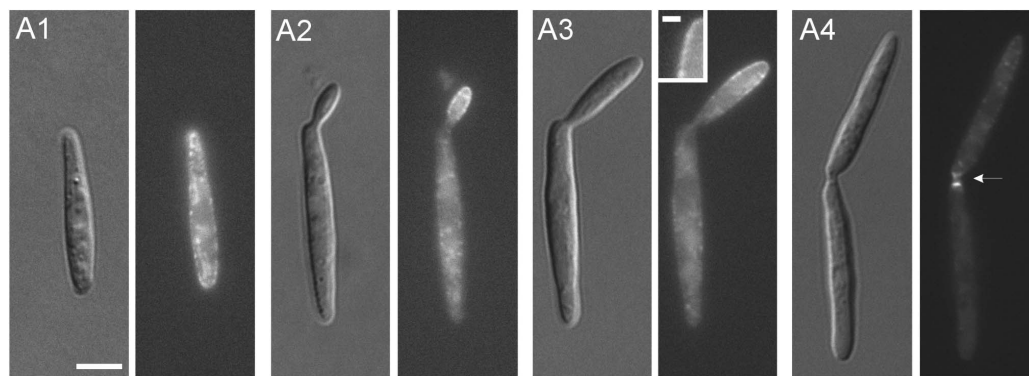


Abb. 36: Lokalisation von Mcs1YFP in haploiden Sporidien.

In Zellen ohne Knospe war Mcs1YFP gleichmäßig in der Membran verteilt (A1), während es in Zellen mit kleiner und großer Knospe membranständig in der Knospenspitze konzentriert war (A2 und A3). Auch in Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle konnten Mcs1YFP-Signale beobachtet werden (Pfeil in A4). Balken in A1 = 5 μ m, Balken in Vergrößerungsfenster = 1 μ m.

Da ein GFPMyo5-Fusionsprotein in den Spitzen von Konjugationshyphen und dikaryotischen Hyphen lokalisiert (Weber et al., 2003), wurde auch die Lokalisation der Chitinsynthase-Fusionsproteine in Konjugationshyphen und dikaryotischen Filamenten untersucht. Dafür wurden zunächst die Stämme FB2Chs1GFP, FB2Chs2GFP, FB2Chs3GFP, FB2Chs4GFP, FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP mit synthetischem α 1-Pheromon stimuliert und die resultierenden Konjugationshyphen untersucht. Dabei konnten spezifische Chs5GFP-, Chs6GFP-, Chs7YFP- und Mcs1YFP-Signale – ähnlich wie in haploiden Sporidien – polar in der wachsenden Spitze detektiert werden (Abb. 37). Eine spezifische Lokalisation von Chs1GFP, Chs2GFP, Chs3GFP und Chs4GFP konnte in Konjugationshyphen nicht gefunden werden. Es bleibt somit ungewiss, ob die Chitinsynthasen Chs1, Chs2, Chs3 und Chs4 in diesem Stadium exprimiert werden.

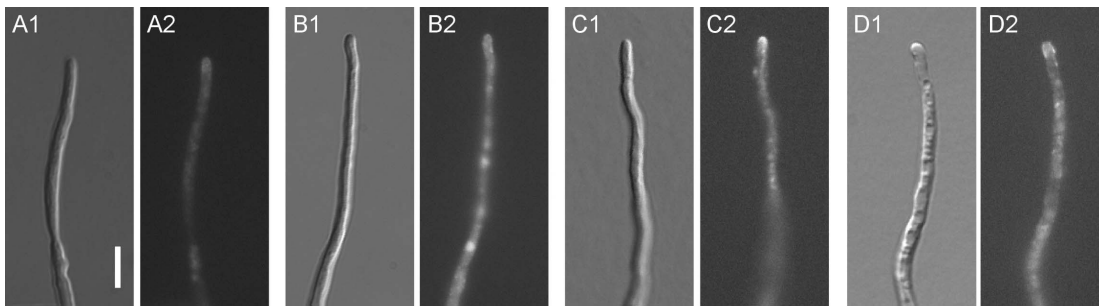


Abb. 37: Lokalisation von Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP in Konjugationshyphen.

Chs5GFP (A1 und A2), Chs6GFP (B1 und B2), Chs7YFP (C1 und C2) und Mcs1YFP (D1 und D2) lokalisierten membranständig in der Spitze von Konjugationshyphen. Balken = 5 µm.

Um die Lokalisation der Chitinsynthasen in dikaryotischen Hyphen zu analysieren, wurden Kreuzungen von FB2Chs1GFP, FB2Chs2GFP, FB2Chs3GFP, FB2Chs4GFP, FB2Chs5GFP und FB2Chs6GFP mit dem kompatiblen Wildtypstamm FB1 auf aktivkohlehaltigem Medium durchgeführt. In all diesen Kreuzungen kam es zur Ausbildung weißer, pelzartiger Kolonien, die auf die Bildung dikaryotischer Hyphen zurückzuführen ist. In diesen dikaryotischen Hyphen lokalisierten Chs3GFP, Chs4GFP, Chs5GFP und Chs6GFP in neu gebildeten basalen Septen und Chs5GFP und Chs6GFP zusätzlich in der Hyphenspitze (Abb. 38). In dikaryotischen Hyphen konnte keine spezifische Lokalisation von Chs1GFP und Chs2GFP beobachtet werden.

Die Lokalisationen von Chs7 und Mcs1 in der Hyphe wurden in den Stämmen AB33Chs7YFP und AB33Mcs1YFP näher untersucht. Dazu wurden die Plasmide pSLH-Chs7-YFP-hom und pSLH-Mcs1-YFP-hom kloniert, jeweils homolog in den endogenen Locus von AB33 integriert und durch Southern-Analysen bestätigt (nicht gezeigt). Die Fusionsproteine Chs7YFP und Mcs1YFP wurden somit unter Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors exprimiert.

Durch Medienwechsel kann in AB33 die *b*-Genexpression induziert werden, und es kommt somit zur Ausbildung filamentöser Strukturen, die morphologisch mit dikaryotischen Hyphen vergleichbar sind (Brachmann, 2001). In diesen Filamenten konnten schwache Chs7YFP-Signale am basalen Septum beobachtet werden, während Mcs1YFP deutlich in neu gebildeten Septen lokalisierte. Zudem waren sowohl Chs7YFP- als auch Mcs1YFP-Signale in den Spitzen eines AB33-Filaments zu finden, wobei Chs7YFP ähnlich wie in haploiden Sporidien in der Spitze fokussiert zu sein schien, während Mcs1YFP einen Gradienten zur Hyphenspitze bildete.

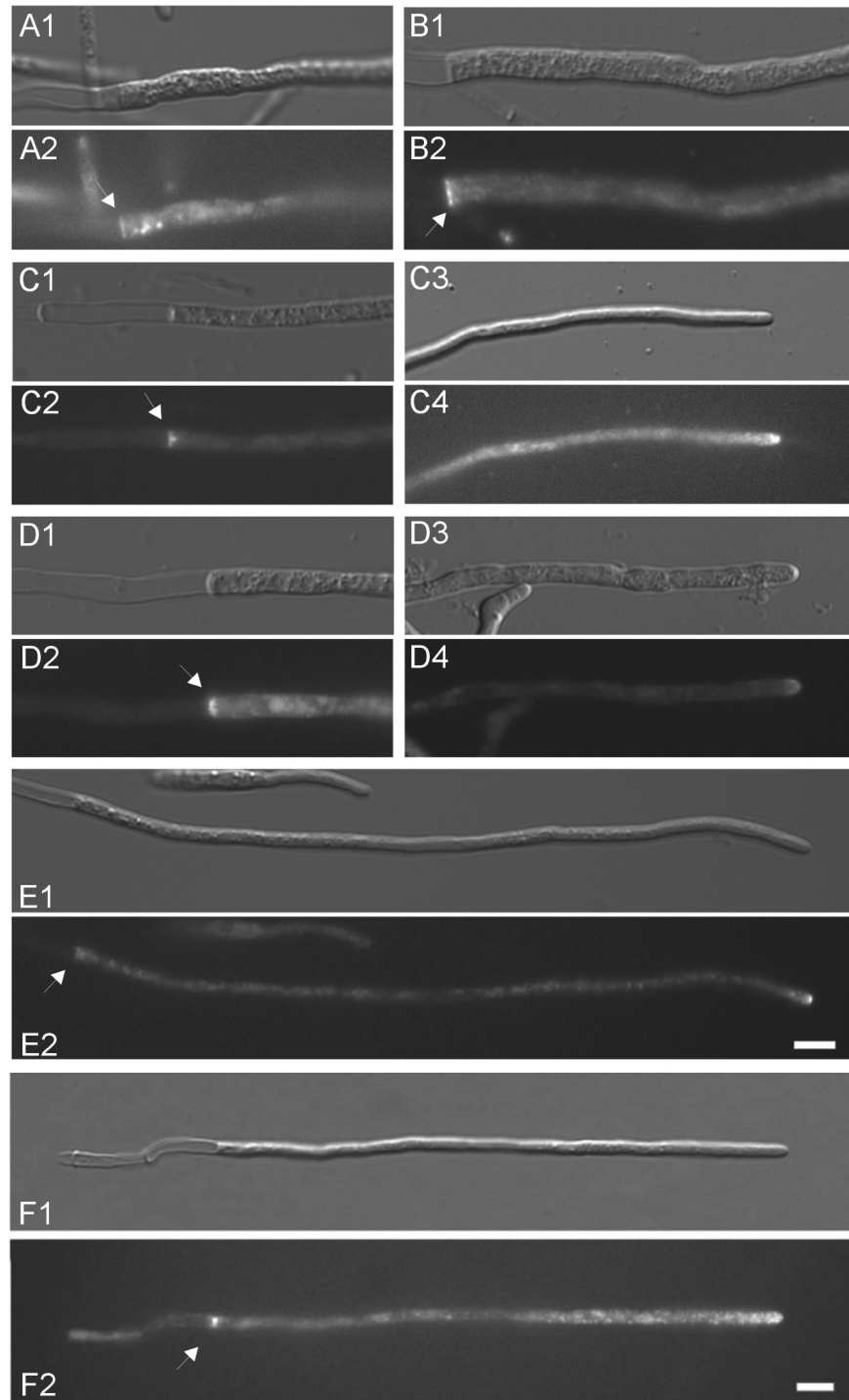


Abb. 38: Lokalisation von Chs3GFP, Chs4GFP, Chs5GFP und Chs6GFP in dikaryotischen Hyphen und Lokalisation von Chs7YFP und Mcs1YFP in einem AB33-Filament.

Chs3GFP (A1 und A2), Chs4GFP (B1 und B2), Chs5GFP (C1 und C2) und Chs6GFP (D1 und D2) lokalisierten am basalen Septum dikaryotischer Hyphen. Der Stamm AB33Chs7YFP (E2) zeigte schwache Signale am basalen Septum, während Mcs1YFP (F2) deutlich an neu gebildeten Septen lokalisierte. Die Chitinsynthasen Chs5 (C3 und C4), Chs6 (D3 und D4), Chs7 (E1 und E2) und Mcs1 (F1 und F2) wiesen zusätzlich eine polare Lokalisation in der Hyphenspitze auf. F: Zur Verfügung gestellt von Dr. G. Steinberg. Balken in E2 und F2 = 5 μ m.

Alle untersuchten Chitinsynthase-Fusionsproteine (Chs3GFP, Chs4GFP, Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP) lokalisieren an Septen haploider Sporidien und Filamenten. Dies könnte erklären, warum die einzelnen Deletionen von *chs3* und *chs4* keine phänotypischen Veränderungen der Zellen nach sich ziehen. Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP lokalisieren zusätzlich in Spitzen von Sporidien, Konjugationshyphen und Filamenten (Tabelle 8).

Tabelle 8: Lokalisationsdaten der Chitinsynthase-Fusionsproteine.

Fusionsprotein	Sporidie		Konjugations -hyphe	Dikaryotische Hyphe bzw. AB33-Filament*	
	Knospenspitze	Septen		Spitze	Septum
Chs3GFP	-	++	-	-	++
Chs4GFP	-	++	-	-	++
Chs5GFP	++	++	+	++	++
Chs6GFP	+	++	+	++	++
Chs7YFP	++	++	++	++	+
Mcs1YFP	++	++	++	++	++

-: kein Signal, +: schwaches Signal, ++: deutliches Signal.

* Ein Vergleich der Intensitäten der Signale in dikaryotischen Hyphen mit Signalen in AB33-Filamenten ist schwierig, da die von aktivkohlehaltigen Agarplatten stammenden Hyphen andere Wachstumsbedingungen hatten als die aus Flüssigkultur stammenden AB33-Filamente.

Die beobachtete polare Lokalisation deckt sich sehr gut mit der festgestellten Hypersensitivität von $\Delta chs5$ -, $\Delta chs6$, $\Delta chs7$ und $\Delta mcs1$ -Zellen gegenüber Nikkomycin Z (vgl. 2.2.3.4). In diesen Inhibitor-Versuchen zeigten insbesondere $\Delta chs1$ -Zellen eine deutliche Hypersensitivität, jedoch konnte für Chs1GFP eine Lokalisation weder in haploiden Sporidien noch in Konjugationshyphen oder in Filamenten beobachtet werden. Gleiches galt für Chs2GFP. Da entsprechende Transkripte von *chs1* und *chs2* bereits nachgewiesen worden sind (Gold und Kronstad, 1994), wurde die Proteinexpression von Chs1GFP und Chs2GFP überprüft. Dafür wurden zweimal unabhängig voneinander Proteinextrakte der Stämme FB2Chs1GFP und FB2Chs2GFP hergestellt. Nur in Extrakten von FB2Chs1GFP konnte eine Bande mittels GFP-Antikörper detektiert werden, die der Größe des Chs1GFP-Fusionsproteins von 128,4 kDa entsprach (nicht gezeigt). Dass dennoch kein spezifisches Signal in haploiden Sporidien, Konjugationshyphen und dikaryotischen Hyphen beobachtet werden konnte, könnte auf eine Verteilung des Fusionsproteins über das Cytoplasma zurückzuführen sein. Warum allerdings Chs2GFP mittels Western-Blot nicht detektiert werden konnte, muss an dieser Stelle offen bleiben.

Die durchgeführten Lokalisationsversuche bestätigten die durch die Nikkomycin Z-Hypersensitivität angedeutete polare Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1. Diese Chitinsynthasen haben in allen Zellzyklusstadien ein ähnliches Lokalisationsverhalten wie Myo5 und stellen mögliche „Cargos“ von Myo5 dar.

2.2.4.2 Abhängigkeit der Lokalisation polarer Chitinsynthasen vom Cytoskelett

Die beschriebenen Versuche zeigten, dass die Chitinsynthasen Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1, ähnlich wie Myo5, an den Wachstumszonen lokalisieren. $\Delta chs5$ - und $\Delta chs7$ -Zellen wiesen zudem vergleichbare Zelltrennungsdefekte wie $\Delta myo5$ - und $myo5^{ts}$ -Zellen auf (vgl. Einleitung), und $\Delta chs5$ -, $\Delta chs6$ -, $\Delta chs7$ und $\Delta mcs1$ -Zellen zeigten eine vergleichbare Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z wie $myo5^{ts}$ -Zellen. Um einschränken zu können, welche Chitinsynthase möglicherweise von Myo5 transportiert wird, wurde zunächst untersucht, ob die polare Lokalisation von Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP aktin- oder mikrotubuliabhängig ist.

Dazu wurden die Stämme FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP für ca. zwei Stunden (im Falle von Mcs1YFP für ca. drei Stunden) mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl, dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A (Coue et al., 1987) und in Kontrollexperimenten mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die DMSO-Behandlung sowie die Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts durch 20 μ M Benomyl (Steinberg et al., 2001; Straube et al., 2003) führte zu keiner signifikanten Verteilungsänderung der untersuchten Chitinsynthase-Fusionsproteine (Abb. 39, A1-D1, A2-D2). Die Hemmung der Aktinpolymerisation durch 50 μ M Latrunculin A, die auch durch spätere Versuche mit Fim1GFP bestätigt werden konnte (vgl. 2.2.5.1), resultierte hingegen in einer deutlichen Verteilungsänderung aller Chitinsynthasen (Abb. 39).

Nach zweistündiger Inkubation waren in den Stämmen FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP noch membranständige Signale vorhanden, jedoch nahm die Stärke des Signals deutlich ab, und der Signalgradient zur Knospenspitze hin war nicht mehr erkennbar (Abb. 39, A3-D3). Besonders auffällig zeigte sich dies bei FB2Chs7YFP (Abb. 39, C3) und FB2Mcs1YFP (Abb. 39, D3). Im Falle von Mcs1YFP konnten auch Akkumulationen im Cytoplasma beobachtet werden (nicht gezeigt).

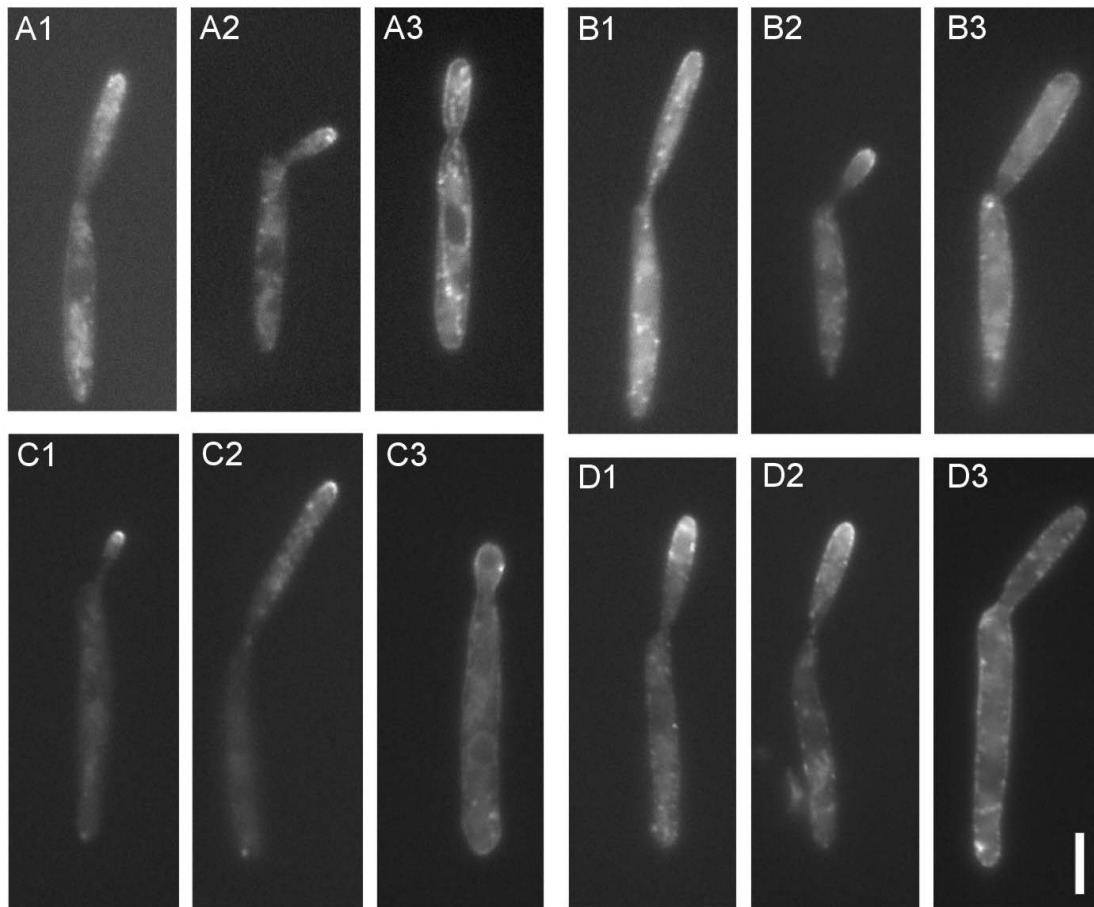


Abb. 39: Die Lokalisation von Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP ist aktin-abhängig.

Die Lokalisation von Chs5GFP (A1), Chs6GFP (B1), Chs7YFP (C1) und Mcs1YFP (D1) war nach DMSO-Behandlung weitgehend unverändert. Inkubation mit 20 μ M Benomyl hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung von Chs5GFP (A2), Chs6GFP (B2), Chs7YFP (C2) und Mcs1YFP (D2). Bei Behandlung der Zellen mit 50 μ M Latrunculin A ging die polare Lokalisation von Chs5GFP (A3), Chs6GFP (B3), Chs7YFP (C3) und Mcs1YFP (D3) weitestgehend verloren. Balken in D3 = 5 μ m.

Diese Experimente verdeutlichen die Wichtigkeit von Myosinen für die Chitinsynthase-Lokalisation, da nach Störung aktinabhängiger Transportprozesse eine deutliche Chitinsynthase-Fehlverteilung auftrat. Im Gegensatz hierzu scheint das Mikrotubuli-Cytoskelett für die Verteilung von Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP nicht von elementarer Bedeutung zu sein.

2.2.5 Ist Myo5 an der Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 beteiligt?

2.2.5.1 *in vivo* Aktin-Lokalisation durch ein Fimbrin-GFP-Fusionsprotein

Da die Lokalisation der vier polaren Chitinsynthasen aktinabhängig war, sollte im weiteren ihr Lokalisationsverhalten in *myo5^{ts}*-Zellen untersucht werden. Der Phänotyp von *myo5^{ts}*-Zellen ist besonders nach Temperaturshift der Zellen von 20°C bzw. 22°C auf 34°C zu beobachten. Da jedoch in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, dass durch Temperaturerhöhung das Aktin-Cytoskelett kurzzeitig in seiner Organisation gestört sein kann (Lillie und Brown, 1994; Desrivieres et al., 1998) und ähnliches vermutlich auch bei der Temperaturerhöhung von *myo5^{ts}*-Zellen auf 34°C kurzzeitig eintritt (G. Steinberg, pers. Mitteilung), wurden Bedingungen gesucht, die zur Ausprägung des Phänotyps führten, jedoch eine Störung des Aktin-Cytoskeletts nicht zur Folge hatten.

Bei der geringeren Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C kam es bei *myo5^{ts}*-Zellen ebenfalls zu Ausprägung des Phänotyps. Da das *U. maydis* Aktin-Cytoskelett anders als bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* für Rhodamin-Phalloidin Färbemethoden nicht zugänglich ist (G. Steinberg, pers. Mitteilung), musste zunächst ein Markerprotein etabliert werden, um die *in vivo* Aktin-Lokalisation in von 20°C auf 28°C geshifteten *myo5^{ts}*-Zellen zu untersuchen.

Mit Hilfe des Fimbrins AtFim1 konnte das dynamische Aktinnetzwerk in *Arabidopsis thaliana* bereits erfolgreich lokalisiert werden (Kovar et al., 2001). Um einen analogen Marker in *U. maydis* zu etablieren, wurde die genomische Sequenz von *U. maydis* nach Fimbrin-Homologen durchsucht. Dabei wurde das Gen *fim1* gefunden, das für ein 615 Aminosäuren langes Protein mit höchster Homologie zu anderen pilzlichen Fimbrinen kodiert (62% Identität zu Sac6p aus *S. cerevisiae* und 61% zu Fim1 aus *S. pombe*, vgl. Abb. 40, A). Auch die Domänenstruktur von Fim1 entspricht der von Fimbrinen. So enthält der N-Terminus des Proteins eine EF-Hand Domäne, die an der Bindung von Calcium beteiligt sein soll (Prassler et al., 1997). Zudem besteht der größte Teil des Proteins aus vier „Calponin homology“ (CH) Domänen (Abb. 40, B). Jeweils zwei dieser CH-Domänen stellen eine Aktinbindungsdomäne dar. Fimbrine bzw. Fimbrin-ähnliche Moleküle enthalten zwei dieser Aktinbindungsdomänen (Volkman et al., 2001; Goodman et al., 2003), wobei jede einzelne dieser Domänen in der Lage ist, ein Aktinmonomer in einem Filament zu binden.

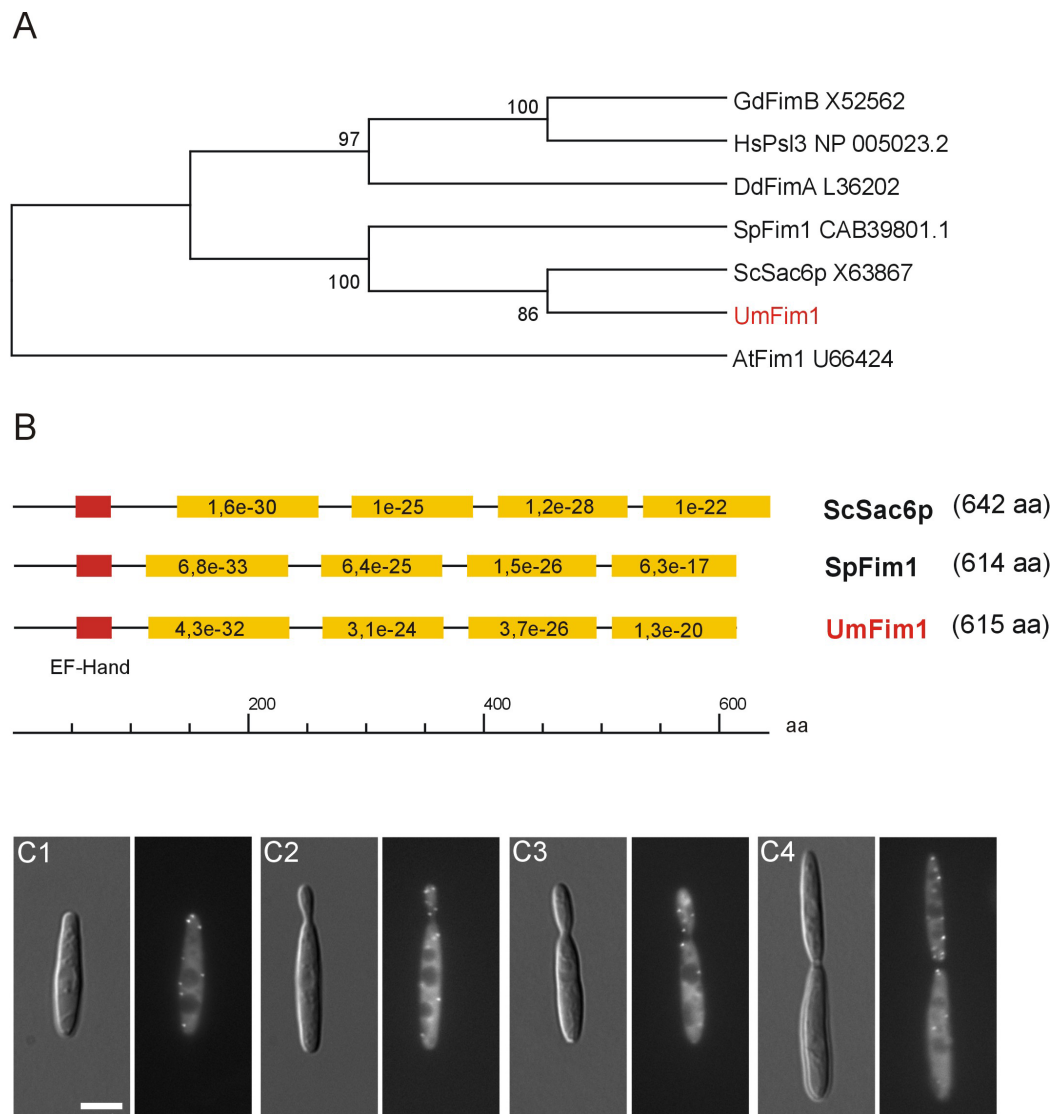


Abb. 40: Fim1. Stammbaum frimbrinähnlicher Proteine, Domänenstruktur und Lokalisation.

A: In einem phylogenetischen Dendrogramm ausgewählter Fimbrine zeigt Fim1 die höchste Verwandtschaft zu Sac6p aus *S. cerevisiae*.

B: Fim1 aus *U. maydis* zeigt eine ähnliche Domänenorganisation wie Sac6p aus *S. cerevisiae* und Fim1 aus *S. pombe*. Es enthält vier charakteristische CH-Domänen, von denen jeweils zwei an der Bindung eines Aktinfilaments beteiligt sind.

C: Das Fim1GFP-Fusionsprotein färbte fleckige, motile Strukturen (sog. „actin patches“), die im Cytoplasma haploider Sporidien verteilt sind. In Zellen mit kleiner Knospe kommt es zu einer leichten Akkumulation dieser Strukturen in der Knospe (C2). Filamentöse Strukturen wurden in keinem Zellzyklusstadium sichtbar. Balken in C1 = 5 μ m.

Da die Überexpression des Fimbrins Sac6p in *S. cerevisiae* letal ist (Sandrock et al., 1999), wurde für die *in vivo* Lokalisation von Fim1 ein homologes GFP-Fusionsprotein hergestellt. Dafür wurde das Plasmid pSLB-Fim1GFP-hom kloniert und in den *fim1*-Lokus des Wildtypstamms FB2 integriert. Durch Southern-Analyse wurde die erfolgreiche

homologe Rekombination überprüft (nicht gezeigt). Das resultierende Fim1GFP-Fusionsprotein färbte im Cytoplasma haploider Sporidien verteilte motile Flecken (Abb. 40, C), welche in Zellen mit Knospe gehäuft in der Knospe vorhanden waren ($56,3\% \pm 9,8$ der angefärbten Flecken befanden sich in einer kleinen Knospe, $n = 10$). Diese Flecken bewegten sich mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit ($0,28 \mu\text{m/s} \pm 0,28$), wie sie für sog. „actin patches“ bereits beschrieben wurde (Doyle und Botstein, 1996; Waddle et al., 1996). Filamentöse Strukturen wurden nicht angefärbt. Um weitere Hinweise zu erhalten, dass es sich bei diesen motilen Strukturen tatsächlich um „actin patches“ handelte, wurde der Stamm FB2Fim1GFP mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl und dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A behandelt. Kontrollzellen und Zellen, die mit dem Mikrotubuli depolymerisierenden Agens Benomyl ($20 \mu\text{M}$) für 30 Minuten inkubiert wurden, zeigten eine normale Fim1GFP-Lokalisation (Abb. 41). Die Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Latrunculin A führte hingegen in 30 Minuten zu einem vollständigen Verschwinden der Fim1GFP-Signale in der Zelle (Abb. 41). Dies bedeutet, dass die Fim1GFP-Lokalisation von einem intakten Aktin-Cytoskelett abhängig ist.

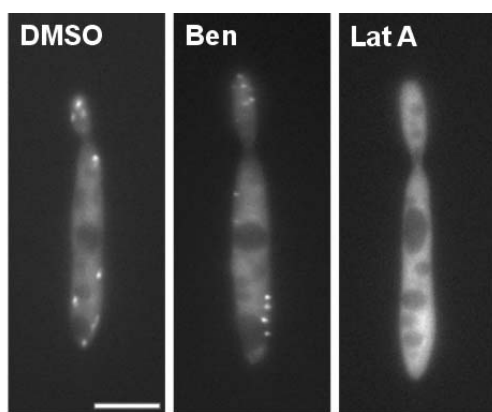


Abb. 41: Fim1GFP-Lokalisation ist aktin-abhängig.

Fim1GFP-Lokalisation war durch DMSO nicht beeinträchtigt. Ebenso führte die Behandlung mit Benomyl (Ben) zu keiner Beeinträchtigung der Lokalisation, während nach Latrunculin A (Lat A) Behandlung das Fim1GFP-Signal verschwand. Balken = $5 \mu\text{m}$.

Sowohl die Lokalisation und die Motilität als auch die Latrunculin A-Sensitivität der durch Fim1GFP angefärbten Flecken deckte sich mit der von „actin patches“ und bedeutete, dass Fim1GFP für die folgenden Experimente als Aktin-Marker verwendet werden konnte.

Um eine kurzzeitige Schädigung des Aktin-Cytoskeletts in *myo5^{ts}*-Zellen ausschließen zu können, wurde sowohl die Lokalisation als auch die Motilität der Fim1GFP-Signale nach Temperaturshift von 20°C auf 28°C in dem Stamm FB2Fim1GFP untersucht. Weder nach einstündiger noch nach dreistündiger Inkubation des Stammes FB2Fim1GFP bei 28°C konnte ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation der durch FimGFP angefärbten

„actin patches“ beobachtet werden. Nach einer Stunde bei 28°C befanden sich in Zellen mit kleiner Knospe $66,3 \pm 19,0\%$ ($n = 6$) der Fim1GFP-Signale in der Knospenspitze, nach drei Stunden $53,7 \pm 6,7\%$ ($n = 6$, Anova-Test: keine signifikanten Unterschiede $P: 0,191$). Auch die für „actin patches“ charakteristische Motilität war nicht beeinträchtigt (Abb. 42).

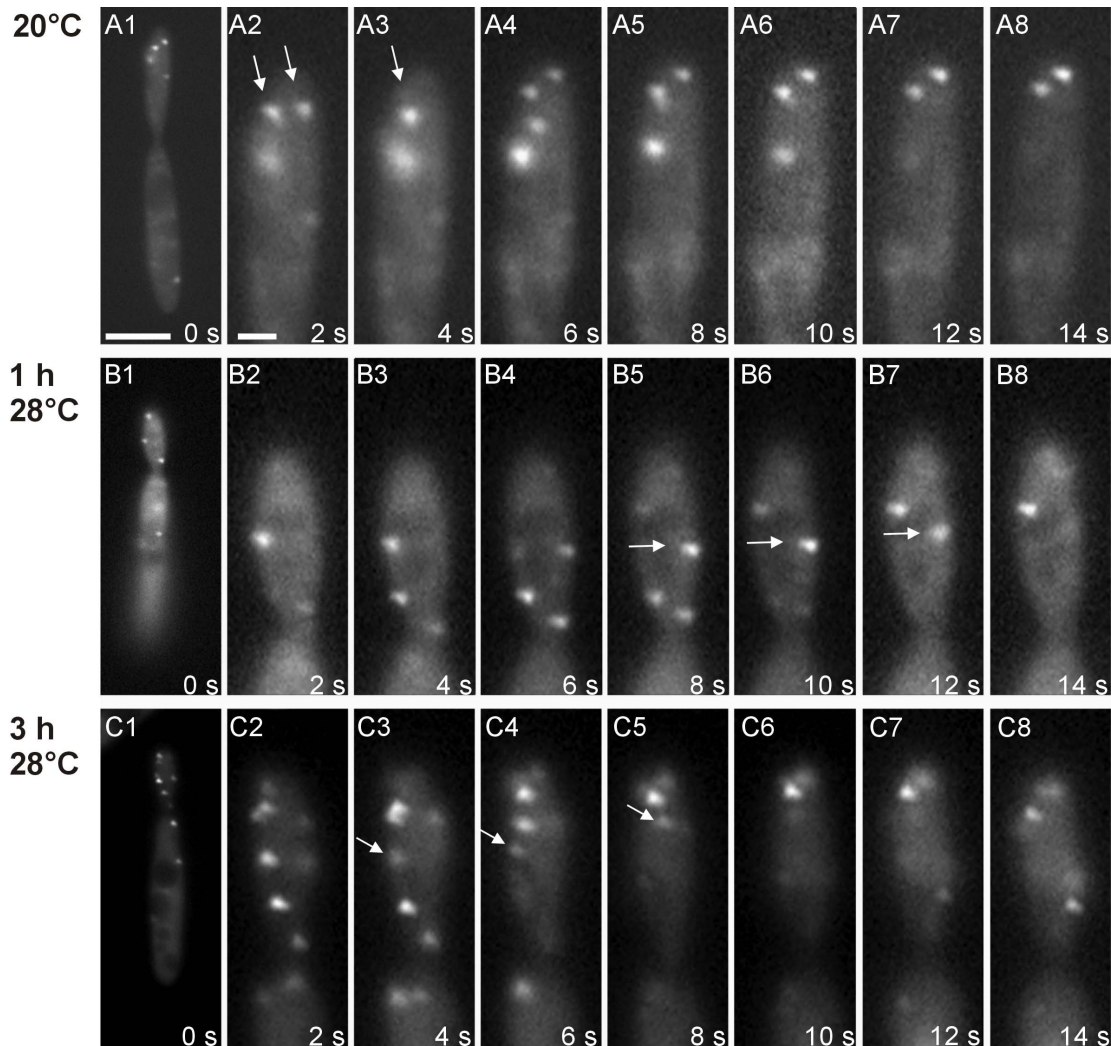


Abb. 42: Fim1GFP nach Temperaturshift von 20°C auf 28°C.

Nach Inkubation bei 20°C sowie 1 h und 3 h nach Temperaturshift auf 28°C wurden Filmsequenzen aufgenommen. Die dargestellten Bilder einer Sequenz wurden in zeitlichen Abständen von zwei Sekunden aufgenommen. Sowohl nach 1 h bei 28°C als auch nach 3 h bei 28°C sind die durch Fim1GFP angefärbten Aktinflecken ähnlich beweglich wie bei 20°C. Die Temperaturerhöhung hat keinen Einfluss auf die Bewegung. Die beiden in A2 mit Pfeilen gekennzeichneten Flecken sind zwei Sekunden später zu einem Fleck fusioniert (Pfeil in A3). B4-B7 und C3-C5 zeigt die Bewegung eines „actin patches“ durch bzw. innerhalb der Fokusebene. Balken in A1 = 5 μm , in A2 = 1 μm .

Da weder die Lokalisation noch die Motilität der „actin patches“ nach Temperaturshift verändert war, konnte ein negativer Einfluss auf das Aktin-Cytoskelett von *U. maydis* durch die Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis konnte durch Immunfluoreszenz bestätigt werden (G. Steinberg, nicht veröffentlicht).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die gewählte Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C, die bei *myo5^{ts}*-Zellen zur Ausbildung des charakteristischen Phänotyps führt, keine Beeinträchtigung des Aktin-Cytosketts nach sich zieht.

2.2.5.2 Lokalisation der polaren Chitinsynthasen in *myo5^{ts}*-Mutanten

Die aktinabhängige Lokalisation der Chitinsynthasen Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 unterstützte die Hypothese, dass die Lokalisation dieser Chitinsynthasen von Myo5 abhängig sein kann. Um dies zu überprüfen, wurden die entsprechenden Konstrukte pSLB-Chs5-GFP-hom, pSLB-Chs6-GFP-hom, pSLB-Chs7-YFP-hom und pSLB-Mcs1-YFP-hom in FB2Myo5^{ts} transformiert. Die erfolgreichen Integrationen in die Loci wurden durch Southern-Blot überprüft (nicht gezeigt). In den resultierenden Stämmen FB2Myo5^{ts}Chs5GFP, FB2Myo5^{ts}Chs6GFP, FB2Myo5^{ts}Chs7YFP und FB2Myo5^{ts}Mcs1YFP lokalisierten die Chitinsynthasen bei permissiver Temperatur ähnlich wie im Wildtyphintergrund (nicht gezeigt). In mindestens zwei unabhängigen Experimenten wurde mit diesen Stämmen ein Temperaturshift von 20°C auf 28°C durchgeführt, um die Lokalisation der Chitinsynthasen nach einstündiger und dreistündiger Temperaturerhöhung zu untersuchen (Tabelle 9). Als Kontrolle wurden auch die Stämme FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP einem Temperaturshift unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Bei 20°C zeigten ähnlich viele Zellen der Stämme FB2Myo5^{ts}Chs5GFP, FB2Myo5^{ts}Chs6GFP, FB2Myo5^{ts}Chs7YFP und FB2Myo5^{ts}Mcs1YFP ein Signal in der Knospenspitze wie die entsprechenden Kontrollstämme FB2Chs5GFP, FB2Chs6GFP, FB2Chs7YFP und FB2Mcs1YFP (Tabelle 9). Nach Temperaturshift auf 28°C für eine bzw. für drei Stunden traten in keinem der Kontrollstämme wesentliche Veränderungen in der Chitinsynthase-Lokalisation auf. Bei FB2Myo5^{ts}Chs5GFP und FB2Myo5^{ts}Chs6GFP reduzierte sich die Anzahl der Zellen mit polarem Signal nach einstündiger Inkubation bei 28°C nur geringfügig (Tabelle 9). Bei FB2Myo5^{ts}Mcs1YFP zeigten alle untersuchten Zellen ein Signal in der Knospenspitze. Auch nach 3 h bei 28°C zeigten sich keine

deutlichen Unterschiede in der Chitinsynthese-Verteilung bei FB2Myo5^{ts}Chs5GFP, FB2Myo5^{ts}Chs6GFP und FB2Myo5^{ts}Mcs1YFP (Tabelle 9).

Tabelle 9: Chitinsynthese-Fusionsproteine nach Temperaturshift im Wildtyp und Myo5^{ts}

Stamm	20°C	n	1 h 28°C	n	3 h 28°C	n
FB2Chs5GFP	87%	23	91,3%	23	100%	21
FB2Myo5 ^{ts} Chs5GFP	89,4 ± 3,7%	48	80,3 ± 0,4%	54	84,7 ± 4, %0	44
FB2Chs6GFP	85,2%	27	88,0%	27	91,7%	24
FB2Myo5 ^{ts} Chs6GFP	89,5 ± 14,8%	34	84,2 ± 2,2%	37	89,6 ± 1,9%	39
FB2Chs7YFP	100%	30	96,7%	31	93,8%	32
FB2Myo5 ^{ts} Chs7YFP	86,7 ± 4,0%	56	41,3 ± 6,9%	59	78,9 ± 5,5%	37
FB2Mcs1YFP	100%	20	100%	20	100%	20
FB2Myo5 ^{ts} Mcs1YFP	98,2 ± 2,6%	48	100%	62	94,8 ± 0,6%	39

Angegeben ist die Anzahl der Zellen mit kleiner oder mittlerer Knospe, die ein polares Signal in der Spitze zeigten. Im Fall von FB2Myo5^{ts}Chs5GFP, FB2Myo5^{ts}Chs6GFP, FB2Myo5^{ts}Chs7YFP und FB2Myo5^{ts}Mcs1YFP stammen alle Werte aus zwei unabhängigen Experimenten. n: Anzahl untersuchter Zellen.

Nur bei FB2Myo5^{ts}Chs7YFP-Zellen war ein signifikanter Unterschied nach Temperaturshift zu beobachten. Die Anzahl der Zellen, die ein Signal in der Knospenspitze aufwiesen, sank nach 1 h bei 28°C von 86,7% auf 41,3% (Tabelle 9 und Abb. 43, A). Zellen ohne polares Signal zeigten eine hohe cytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz (Abb. 43, A und B2). Interessanterweise besaßen jedoch nach dreistündiger Inkubation bei 28°C 78,9 ± 5,5% der Zellen wieder ein polares Chs7YFP-Signal, d. h. eine Repolarisierung hatte stattgefunden (Tabelle 9 und Abb. 43, A und B3).

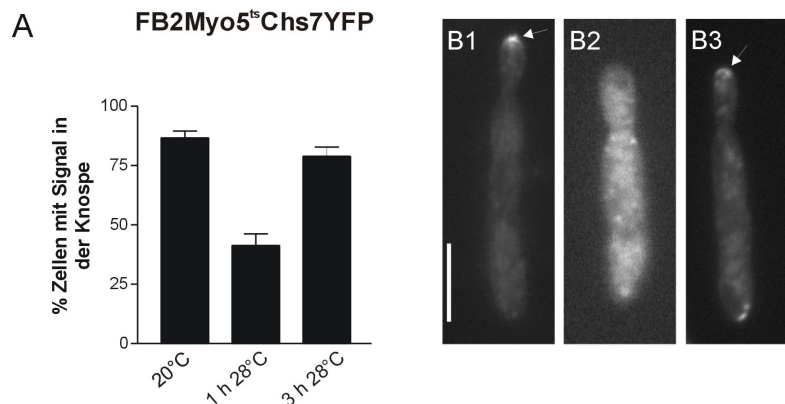


Abb. 43: Chs7YFP-Lokalisation nach Temperaturerhöhung in myo5^{ts}-Zellen.

Nach Inkubation bei 20°C zeigten 86,7 ± 4% der Zellen ein polares Signal (A1 und B1), nach 1 h bei 28°C nur noch 41,3 ± 6,9% der Zellen (A2). Zellen ohne polares Signal hatten eine hohe Hintergrundfluoreszenz (B2). Drei Stunden nach Temperaturerhöhung zeigten wieder deutlich mehr Zellen ein polares Chs7YFP-Signal (78,9 ± 5,5%, A3 und B3). Balken in B1 = 5 µm.

Ein für Chs7YFP durchgeführter Anova-Test bestätigte, dass der Unterschied zwischen den einzelnen Messwerten signifikant ist ($P : 0,0075$).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass weder Chs5GFP noch Chs6GFP noch Mcs1YFP in *myo5^{ts}*-Zellen fehlverteilt waren. Für Chs7YFP in *myo5^{ts}*-Mutanten nach 1 h bei restriktiver Temperatur ergab sich hingegen eine signifikante Fehlverteilung, was die Beteiligung von Myo5 an der Lokalisation von Chs7 nahe legt. Die Repolarisierung von Chs7YFP nach drei Stunden bei 28°C ist überraschend.

2.2.6 Was ist die Ursache der Repolarisierung von Chs7YFP in Myo5^{ts}?

2.2.6.1 GFPMyo5^{ts} befindet sich nach 3 h bei 28°C polar in der Knospe

Wie die vorangehend beschriebenen Versuche ergaben, ist Chs7YFP in *myo5^{ts}*-Zellen nach 1 h bei 28°C fehlverteilt, nach 3 h bei 28°C allerdings nicht mehr. Eine temporäre Beeinträchtigung des Aktin-Cytoskeletts konnte durch Untersuchungen mit Fim1GFP ausgeschlossen werden, so dass die Repolarisierung von Chs7YFP andere Ursachen haben muss. Auf der Suche nach möglichen Ursachen wurde zunächst überprüft, was mit dem Myo5 Protein nach Temperaturshift auf 28°C passiert. Dies könnte klären, ob Myo5 selbst für die Repolarisierung von Chs7 verantwortlich ist, oder ob eventuell andere Motormoleküle an der Lokalisation von Chs7YFP beteiligt sind.

Das Plasmid pMGMyo5^{ts}, das die kodierende Sequenz des GFPs fusioniert an den N-Terminus des Myo5^{ts}-Alleles enthält, wurde kloniert. Die ektopische Integration in $\Delta myo5$ -Zellen resultierte in dem Stamm FB2GFPMyo5^{ts}. Die Expression von GFPMyo5^{ts} in $\Delta myo5$ -Zellen führte bei 20°C zur Aufhebung des charakteristischen Deletionsphänotyps (Abb. 44, B1). Nach längerer Inkubation bei 28°C zeigten die Zellen die typischen Zelltrennungsdefekte. Ähnlich wie in dem Stamm FB2MGMyo5, der GFPMyo5 exprimiert, lokalisierte GFPMyo5^{ts} punktuell in den Knospen haploider Sporidien und in den Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle. In drei bis sechs unabhängigen Experimenten wurde die GFPMyo5^{ts}-Lokalisation in der Knospe nach Temperaturshift untersucht.

Bei 20°C zeigten $56,3 \pm 9,7\%$ der Zellen mit Knospe ein polares GFPMyo5-Signal ($n = 136$, sechs unabhängige Experimente, vgl. Abb. 44, A und B1), während nach Temperaturshift auf 28°C nur noch $13,9 \pm 8,3\%$ der Zellen ein derartiges Signal zeigten

(n = 121, sechs unabhängige Experimente, vgl. Abb. 44, A und B2). Die Temperaturerhöhung auf 28°C bewirkte folglich eine Reduktion polarer GFPMyo5-Signale. Überraschenderweise trat nach dreistündigem Temperaturshift eine Repolarisierung des GFPMyo5^{ts}-Signals in FB2GFPMyo5^{ts} auf (vgl. Abb. 44, A und B3), ähnlich wie dies für Chs7YFP in dem Stamm FB2Myo5^{ts}Chs7YFP beobachtet worden war (vgl. 2.2.5). 58,7 ± 13,7% der Zellen zeigten wieder ein punktuell polarisiertes GFPMyo5-Signal (n = 75, drei unabhängige Experimente).

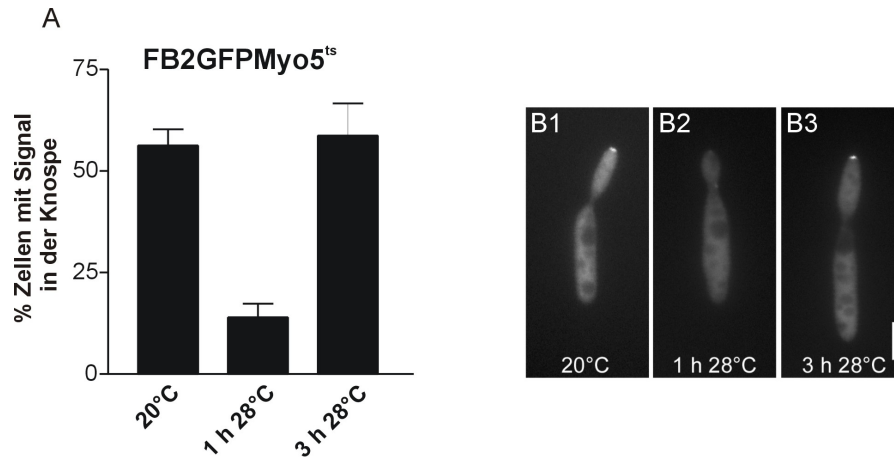


Abb. 44: GFPMyo5^{ts}-Lokalisation nach Temperaturshift.

Bei 20°C zeigten durchschnittlich 56,3% der Zellen mit Knospe ein polares GFPMyo5-Signal (A, B1). Dieses sank nach 1 h bei 28°C auf durchschnittlich 14% (A, B2) und stieg nach 3 h bei 28°C wieder auf durchschnittlich 58,7% (A, B3). Balken in B3 = 5 µm.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass GFPMyo5 nach einem einstündigem Temperaturshift in seiner polaren Verteilung gestört ist. Die nach drei Stunden zu beobachtende Repolarisierung des GFPMyo5-Signals demonstrierte jedoch, dass das Protein nicht abgebaut worden ist. Die Repolarisierung kann auf ein aktives Myo5-Motormolekül zurückgehen, und somit könnte auch die Repolarisierung von Chs7YFP Myo5-abhängig sein. Es ist allerdings auch denkbar, dass andere Motorsysteme für dieses Phänomen verantwortlich sind.

2.2.6.2 Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} ist aktinabhängig

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die oben angedeuteten möglichen Ursachen der Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} einzugrenzen, indem die Abhängigkeit der Repolarisierung von Cytoskelett- und Myosin-Inhibitoren untersucht wurde. Erneut wurde in drei unabhängigen Experimenten ein Temperaturshift mit dem Stamm FB2GFPMyo5^{ts} durchgeführt. Dabei wurde den Kulturen nach einstündiger Inkubation bei 28°C der

Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl (Endkonzentration = 20 μ M), der Aktin-Inhibitor Latrunculin A (Endkonzentration = 50 μ M) oder der Myosin-Inhibitor BDM (Endkonzentration = 500 μ M) bzw. die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO zugefügt und diese für weitere zwei Stunden bei 28°C inkubiert. Nach Auszählung der Zellen mit polarem GFPMyo5-Signal ergab sich ein eindeutiges Ergebnis. Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt worden waren, zeigten keine Beeinträchtigung der GFPMyo5-Repolarisierung. Durchschnittlich $81 \pm 16,6\%$ der Zellen mit Knospe hatten ein polares GFPMyo5-Signal ($n = 80$). Die Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts durch Benomyl hatte ebenso keinen Einfluss auf die Repolarisierung des GFPMyo5-Signals (polares Signal in $74,5 \pm 20,7\%$ der Zellen mit Knospe, $n = 99$). Wurden die Zellen jedoch mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A behandelt, zeigten nur $1,4 \pm 2,5\%$ der untersuchten Zellen mit Knospe ein polares GFP-Signal ($n = 83$). Die Zellen, die mit dem Myosin-Inhibitor BDM behandelt wurden, zeigten deutlich weniger polare GFPMyo5-Signale (polares Signal in $32,2 \pm 17,9\%$ der Zellen mit Knospe, $n = 92$, drei unabhängige Experimente).

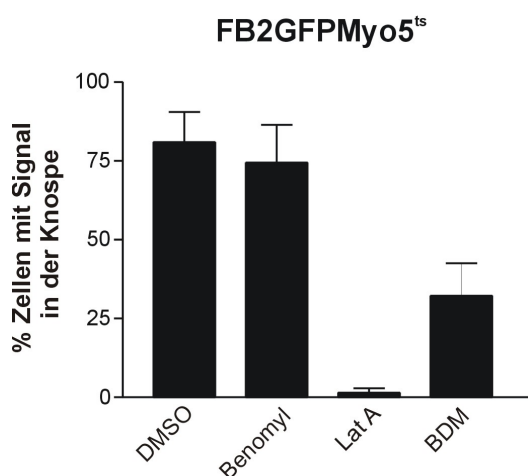


Abb. 45: Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} in Abhängigkeit des Cytoskeletts.

Die hier gezeigten Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Behandlung der Zellen nach einstündiger Inkubation bei 28°C für weitere zwei Stunden mit dem Lösungsmittel und Benomyl hatte keinen Einfluss auf die Repolarisierung von GFPMyo5. Zellen, die mit BDM inkubiert wurden, zeigten deutlich seltener Signale in der Knospenspitze, und nach Verwendung von Latrunculin A (Lat A) konnte nur noch in $1,4 \pm 2,5\%$ der Zellen ein polares GFPMyo5-Signal detektiert werden.

Als Ergebnis ist somit festzuhalten, dass die Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} ein aktinabhängiger Prozess ist. Es bleibt allerdings ungeklärt, ob Myo5^{ts} nach dreistündiger Inkubation bei restriktiver Temperatur selbst für die Repolarisierung verantwortlich ist, d. h. eventuell Motoraktivität aufweist, oder ein oder mehrere andere Myosine an diesem Prozess beteiligt sind. Dass eine Repolarisierung sowohl bei GFPMyo5 als auch bei Chs7YFP beobachtet wurde, deutet an, dass hier dieselben Prozesse zu Grunde liegen könnten.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten mögliche Funktionen des Klasse V Myosins, Myo5, für die Pheromonperzeption, das polare Wachstum und die pathogene Entwicklung von *U. maydis* aufgezeigt werden. Insbesondere während der Zell-Zellerkennung im Kreuzungsprozess und für eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze ist Myo5 von essentieller Bedeutung. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, welche Moleküle oder Organellen von Myo5 transportiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Myo5 an der polaren Verteilung der Klasse IV Chitinsynthase, Chs7, beteiligt ist.

3.1 Die Bedeutung von Myo5 für die pathogene Entwicklung

U. maydis besitzt im Gegensatz zu *S. cerevisiae* (Johnston et al., 1991; Haarer et al., 1994) und *S. pombe* (Goodson et al., 1996; Motegi et al., 2001) nur ein Klasse V Myosin. In *S. cerevisiae* ist eines der Klasse V Myosine, Myo2p, u. a. am Transport sekretorischer Vesikeln, dem polaren Wachstum und der Vakuolenvererbung beteiligt (Johnston et al., 1991; Govindan et al., 1995; Hill et al., 1996; Schott et al., 1999); vgl. Einleitung), während das zweite Klasse V Myosin, Myo4p, u. a. für die Lokalisation der *AHS1* mRNA verantwortlich ist (Jansen et al., 1996; Long et al., 1997). In *S. pombe* sind zwei Klasse V Myosine, Myo51 und Myo52, für den Transport sekretorischer Vesikel und die Cytokinese wichtig (Motegi et al., 2001; Win et al., 2001). Die bekannten Defekte von $\Delta myo5$ -Zellen in der Morphogenese und Cytokinese haploider Sporidien (vgl. Einleitung) deuten eine ähnliche Funktion von UmMyo5 im Vesikeltransport und der polaren Exocytose während des Spitzenwachstums und der Zelltrennung von *U. maydis* an (Weber et al., 2003). Erkenntnisse über den Einfluss von Myosinen auf das polare Hyphenwachstum existieren bislang nur aus *Aspergillus nidulans* (McGoldrick et al., 1995; Yamashita und May, 1998) und *Candida albicans* (Oberholzer et al., 2002; Woo et al., 2003). Welche Bedeutung Myo5 für das polare Wachstum und die damit eng verknüpfte pathogene Entwicklung von *U. maydis* hat, war zu Beginn dieser Arbeit unklar.

3.1.1 *myo5^{ts}*-Mutanten haben Defekte in der Pheromonperzeption und Konjugationshyphenbildung

Die pathogene Entwicklung von *Ustilago maydis* beginnt, wenn zwei kompatible Sporidien sich auf der Pflanzenoberfläche erkennen. Als Reaktion auf das vom Partner sekretierte Pheromon bilden sie Konjugationshyphen aus (Snetselaar et al., 1996). Gleichzeitig werden verschiedene Gene in ihrer Expression hochreguliert, darunter auch *mfa*, das für einen Pheromon-Precursor kodiert (Urban et al., 1996). Um die Rolle von Myo5 für diese initialen Prozesse der pathogenen Entwicklung zu untersuchen, wurde ein Reporterkonstrukt in die zu untersuchenden Stämme integriert, welches die kodierende Sequenz des GFPs unter Kontrolle des *mfa1*-Promotors trägt (Spellig et al., 1996). Eine erfolgte Pheromondetektion der Reporterstämme äußerte sich folglich in GFP-Fluoreszenz. In einem Konfrontationstest und in Stimulationsversuchen mit synthetischem Pheromon wurden sowohl Wildtypreporterstämme als auch *myo5^{ts}*- und Δ *myo5*-Reporterstämme näher untersucht. In Kontrollexperimenten bildeten Wildtypzellen in beiden Experimentanordnungen Konjugationshyphen aus, die mit einer Ausnahme immer auch GFP-Fluoreszenz zeigten. *myo5^{ts}*-Zellen waren bereits bei 20°C, einer Temperatur bei der *myo5^{ts}*-Sporidien überwiegend normal wachsen, in ihrer GFP-Expression und Konjugationshyphenbildung stark gestört, und Δ *myo5*-Zellen bildeten sowohl im Konfrontationstest als auch in Pheromonstimulationen nie Konjugationshyphen aus. Dieser Defekt geht vermutlich auf Probleme der Pheromonperzeption zurück, da in einem Konfrontationstest von *Myo5^{ts}* \leftrightarrow WT die *myo5^{ts}*-Zellen in der Lage waren, Wildtypzellen zu stimulieren, welche daraufhin GFP-Expression und Konjugationshyphenbildung zeigten. Dies deutet an, dass *myo5^{ts}*-Zellen Pheromon sekretiert hatten. Zudem zeigten nur $28,6 \pm 7,6\%$ der *myo5^{ts}*-Zellen nach Pheromongabe bei permissiver Temperatur GFP-Fluoreszenz, was Störungen der Pheromonperzeption andeutet. Konjugationshyphen konnten nur nach Stimulation für weitere sechs Stunden beobachtet werden. Diese Konjugationshyphen waren mit $47,7 \pm 5,8 \mu\text{m}$ deutlich kürzer als die des Wildtyps. Zusammenfassend legen diese Versuche nahe, dass sowohl Δ *myo5*- als auch *myo5^{ts}*-Zellen Defekte in der Pheromonperzeption und in der Ausbildung von Konjugationshyphen haben. Während einige *Myo5^{ts}mG*-Zellen jedoch im Konfrontationstest bei restriktiver Temperatur GFP-Fluoreszenz zeigten, konnte bei Δ *myo5mG*-Zellen nie eine vergleichbare GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (vgl. 2.1.2).

In *S. cerevisiae* ist das pheromoninduzierte Clustern der Rezeptoren aktinabhängig (Ayscough und Drubin, 1998), und somit ist es denkbar, dass in *U. maydis* Myo5 an dem Pheromonrezeptortransport beteiligt ist. Eine gestörte oder nicht mehr vorhandene Lokalisation des Pheromonrezeptors könnte die Defekte von *myo5^{ts}*- und Δ *myo5*-Zellen erklären.

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass sich Δ *myo5*-Zellen und *myo5^{ts}*-Zellen bei restriktiver Temperatur stark in ihrer Stimulierbarkeit unterscheiden. Die die Temperatursensitivität vermittelnde Mutation der *myo5^{ts}*-Zellen liegt in der potentiellen Aktinbindungsregion von Myo5. In der vergleichbaren Mutante *myo2-66* von *S. cerevisiae* führte diese Mutation zu einer beeinträchtigten Aktinbindung (Lillie und Brown, 1994; Reck-Peterson et al., 2001), und daher ist anzunehmen, dass dies auch in *myo5^{ts}*-Zellen bei restriktiver Temperatur der Fall ist. Da *myo5^{ts}*-Zellen nach Wachstum bei restriktiver Temperatur die charakteristischen Morphogenese- und Zelltrennungsdefekte aufweisen, scheint die Störung eines aktinabhängigen Transportprozesses durch Myo5 höchstwahrscheinlich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Myo5 in *myo5^{ts}*-Zellen bei 28°C noch vorhanden ist und darüber hinaus sogar in seiner Lokalisation nicht beeinträchtigt ist. Unter der Annahme, dass die polare Lokalisation von GFPMyo5 auf andere Transportprozesse zurückgeht (vgl. 3.2.7), könnte die im Gegensatz zu Δ *myo5*-Zellen noch vorhandene Stimulierbarkeit von *myo5^{ts}*-Zellen für Funktionen von Myo5 in der Pheromonperzeption sprechen, die unabhängig von einer Aktinbindung ist. Die durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass Myo5 von essentieller Bedeutung für die Pheromonperzeption und Konjugationshyphenbildung ist.

3.1.2 Die Morphologie dikaryotischer Hyphen ist abhängig von Myo5

myo5^{ts}-Zellen waren vermutlich aufgrund der initialen „Matingdefekte“ nicht in der Lage, auf aktivkohlehaltigen Agarplatten dikaryotische Hyphen bei restriktiver Temperatur zu bilden. Um diese Defekte zu umgehen, wurden die Zellen zunächst für zwei Tage bei permissiver Temperatur, anschließend über Nacht bei restriktiver Temperatur inkubiert. Wie erwartet konnten die Zellen bei 20°C fusionieren, und die resultierenden Hyphen konnten nach weiterem Wachstum bei 28°C bzw. 34°C beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass Myo5 nicht essentiell für das polare Wachstum dikaryotischer Hyphen ist, da dikaryotische *myo5^{ts}*-Hyphen zwar unregelmäßig wuchsen, aber dennoch polar. Im Kontrast hierzu resultierte die Deletion des Klasse V Myosins Myo2p in *C. albicans* in

einem Verlust der Hyphenbildung (Woo et al., 2003). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass der mikrotubuliabhängige Endosomentransport für die Hyphenmorphogenese von großer Bedeutung ist (Wedlich-Soldner et al., 2000). Zudem ist das konventionelle Kinesin Kin2 für die Morphogenese dikaryotischer Hyphen wichtig (Lehmle et al., 1997; Steinberg et al., 1998). Dies deutet an, dass sowohl auf F-Aktin als auch auf Mikrotubuli basierende Transportprozesse für das hyphale Spitzenwachstum von *U. maydis* notwendig sind.

Die Tatsache, dass ein funktionelles GFPMyo5-Fusionsprotein fokussiert im Apex einer wachsenden Hyphe lokalisiert, könnte bedeuten, dass Myo5 ähnlich wie Myo2p aus *S. cerevisiae* und die Klasse V Myosine Myo51 und Myo52 aus *S. pombe* an dem Transport sekretorischer Vesikel zur Wachstumsspitze beteiligt ist. Zusätzlich könnte die polare Lokalisation von Myo5 in der Hyphenspitze eine Beteiligung von Myo5 an der Spitzenkörperorganisation andeuten. Mehrere Hinweise aus anderen Organismen sprechen neben einer wichtigen Funktion von F-Aktin im pilzlichen Spitzenwachstum auch für eine essentielle Rolle von Aktin für die Integrität des Spitzenkörpers (Heath et al., 2000; Heath et al., 2003). Aber auch eine Beteiligung von Mikrotubuli an der apikalen Organisation des Spitzenkörpers wird diskutiert (Riquelme et al., 1998), und ebenfalls die mikrotubuliabhängigen Motorproteine, Kinesine und Dynein, scheinen eine Rolle in der Spitzenkörperorganisation auszuüben (Seiler et al., 1997; Wu et al., 1998; Riquelme et al., 2000).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Myo5 von elementarer Bedeutung für das hyphale Wachstum ist, für die Ausbildung der Zellpolarität jedoch nicht essentiell ist. Ein Transport sekretorischer Vesikel zur Wachstumsspitze durch Myo5 ist denkbar, jedoch erscheint auch eine Beteiligung von Myo5 an der Spitzenkörperorganisation möglich.

3.1.3 Myo5 ist essentiell für die Pathogenität von *Ustilago maydis*

Da *myo5^{ts}*-Zellen bereits gravierende Defekte während der Stimulation mit synthetischem Pheromon bei permissiver Temperatur aufzeigten, war es nicht überraschend, dass nach Inkubation infizierter Pflanzen bei restriktiver Temperatur keine Symptome und nach Inkubation bei permissiver Temperatur deutlich weniger Symptome als in Kontroll-Wildtypinfektionen beobachtet werden konnten. Sowohl die Infektionsversuche als auch die durchgeführten mikroskopischen Analysen deuten an, dass bei 20°C auf der Pflanzenoberfläche deutlich weniger *myo5^{ts}*-Hyphen gebildet wurden. Dies könnte

erklären, warum nur 19,4% der Pflanzen – im Vergleich zu 100% in Wildtypinfektionen – Anthocyanbildung zeigten, d. h. vermutlich erfolgreich infiziert wurden (Banuett und Herskowitz, 1996). Mit Chlorazole Black E gefärbte Pflanzenpräparate konnten bestätigen, dass *myo5^{ts}*-Hyphen über eine Appressorien-ähnliche Struktur in die Maispflanzen eindringen. Dies führte aber nur bei 2,7% der mit *myo5^{ts}*-Zellen inokulierten Pflanzen zu einer Tumorbildung. Im Gegensatz zu Wildtypphyphen, die polar durch das Mesophyll wuchsen, verzweigten sich die *myo5^{ts}*-Infektionsstrukturen unmittelbar nach dem Eindringen in die Pflanzen intensiv, und es schien, dass die Infektion der Pflanze unmittelbar an der Eintrittsstelle zum Erliegen kam. Da eine erfolgreiche pathogene Entwicklung des Pilzes das polare Durchwachsen des Pflanzengewebes voraussetzt, könnten diese beobachteten Defekte in der Zellpolarität die Ursache der drastisch reduzierten Tumorbildung sein.

Diese Versuche legen nahe, dass Myo5 von zentraler Bedeutung für die Pathogenität von *U. maydis* ist, da dieser Phänotyp bereits bei einer Temperatur auftrat, bei der haploide Sporidien überwiegend normal wachsen. Mögliche geringe Defekte des *myo5^{ts}*-Alleles scheinen im invasiven Stadium des Pilzes essentiell zu sein. Neben den abnormalen Infektionsstrukturen war auch der gesamte Infektionsprozess der *myo5^{ts}*-Zellen verlangsamt, was ebenfalls eine Ursache der reduzierten Virulenz sein könnte. Während Wildtypphyphen bereits die Pflanze einen Tag nach Injektion erfolgreich infiziert hatten, konnten *myo5^{ts}*-Infektionsstrukturen erst sechs Tage nach Infektion gefunden werden. Möglicherweise bieten ältere Pflanzen deutlich schlechtere Möglichkeiten für eine erfolgreiche Infektion durch den Pilz. Festzuhalten bleibt, dass Myo5 von zentraler Bedeutung für die pathogene Entwicklung des Pilzes ist, insbesondere für ein erfolgreiches, polares Durchwachsen des Pflanzengewebes. Auch die initialen Defekte in der Zell-Zellerkennung scheinen einen Einfluss auf die reduzierte Pathogenität des Pilzes zu haben.

3.2 Chitinsynthasen als potentielles „Cargo“ von Myo5

Einer der wichtigsten Aspekte der vorliegenden Arbeit war die Fragestellung, welches „Cargo“ Myo5 transportiert. In *S. cerevisiae* und in *S. pombe* scheinen Klasse V Myosine Funktionen im Zusammenhang mit der Zellwandsynthese bzw. Zellwandzusammensetzung auszuüben. Die α -Glucan-Synthase Mok1 ist in $\Delta myo52$ -Zellen fehlverteilt (Win et al., 2001). Zudem sind $\Delta myo52$ -Zellen resistent gegenüber dem zellwanddegradierenden Enzym Zymolase sind (Win et al., 2001). Aus *S. cerevisiae* ist eine Beteiligung des Klasse V Myosins Myo2p an der Lokalisation der Chitinsynthase Chs3p bekannt (Santos und Snyder, 1997). Aufgrund dieser aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* stammenden Beobachtungen und Ergebnisse, die aus Antikörper- und Inhibitor-Vorversuche mit *U. maydis* resultierten (vgl. 2.2), wurde eine Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen in Betracht gezogen und im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht.

Das Nucleosiddipeptid Nikkomycin Z wirkt sehr spezifisch als kompetitiver Inhibitor von Chitinsynthasen (Causier et al., 1994; Debono und Gordee, 1994) und wurde bereits in verschiedenen Pilzen erfolgreich zur Chitinsynthase-Inhibition angewendet (Tariq und Devlin, 1996; Kim et al., 2002). In *S. cerevisiae* konnte durch Nikkomycin Z die Aktivität von Chs1p und Chs3p gehemmt werden (Choi et al., 1994; Gaughran et al., 1994). Für *N. crassa* konnte nach Deletion einer Chitinsynthase (*chs1*) eine erhöhte Sensitivität der Zellen nachgewiesen werden (Yarden und Yanofsky, 1991), und *myo5^{ts}*-Zellen zeigten in den durchgeführten Versuchen ebenfalls eine Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z. Die Hypersensitivität indiziert, dass in *myo5^{ts}*-Mutanten anders als in Wildtypzellen bereits Defekte vorliegen, die im Zusammenhang mit der Chitinsynthese und/oder Zellwandbiogenese stehen, unter normalen Bedingungen aber keine Wachstumsbeeinträchtigung zur Folge haben. Erst bei gleichzeitiger Inhibition der Chitinsynthasen durch Nikkomycin Z äußern sich diese Defekte in einer Wachstumshemmung.

Die Antikörperversuche, sowie die Allosamidin- und Nikkomycin Z-Versuche deuteten eine mögliche Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen an (vgl. 2.2). Zur genaueren Untersuchung der Interaktion wurden z. T. neue Chitinsynthase-Deletionsstämme generiert und auf Ähnlichkeiten zu dem Myo5-Mutantenphänotyp untersucht. Darüber hinaus wurden die Chitinsynthasen lokalisiert und die Abhängigkeit ihrer Lokalisation vom Mikrotubuli- und Aktin-Cytoskelett sowie insbesondere von Myo5 untersucht.

3.2.1 Sieben Chitinsynthasen und eine Myosin-Chitinsynthase in *U. maydis*

Die genomische Sequenz von *U. maydis* kodiert für sieben Chitinsynthasen und eine Myosin-Chitinsynthase. Sequenzen von *chs1-chs6* (Gold und Kronstad, 1994; Xoconostle-Cazares et al., 1996; Xoconostle-Cazares et al., 1997) sind bereits veröffentlicht und im Rahmen dieser Arbeit konnten die kodierenden Sequenzen einer Chitinsynthase (*chs7*) und einer Myosin-Chitinsynthase (*mcs1*) gefunden werden. Bei der Bestimmung der 3'-Enden aller *U. maydis* Chitinsynthasen zeigten sich Abweichungen zu den veröffentlichten Sequenzen von *chs3*, *chs4*, *chs5* und *chs6*. Ein Vergleich mit der durch das Whitehead Institut zur Verfügung gestellten genomischen Sequenz lässt darauf schließen, dass die Sequenzen der veröffentlichten 5'-Enden von *chs3* und *chs4* vermutlich ebenfalls falsch sind. Diese fehlerhaften Sequenzen könnten erklären, warum in den veröffentlichten Deletionsstämmen die entsprechenden Gene nicht deletiert waren (vgl. 1.2.2). Im Gegensatz zu dem Modellorganismus *S. cerevisiae*, der drei Chitinsynthasen (Chs1p - Chs3p) der Klassen I, II und IV besitzt, kodiert das Genom filamentös wachsender Pilze somit für deutlich mehr Chitinsynthasen. In *Phycomyces blakesleeanus* konnten beispielsweise zehn Chitinsynthasen identifiziert werden (Miyazaki und Ootaki, 1997). Typisch für Chitinsynthasen sind mehrere Transmembrandomänen (Cabib et al., 1996). Diese sind auch in allen untersuchten Chitinsynthasen (Chs1 - Chs7 und Mcs1) vorhanden. Die Chitinsynthasen von *U. maydis* zeigen zudem eine für Chitinsynthasen charakteristische Primärstruktur. An den eher hydrophilen N-terminalen Bereich schließt sich ein mittlerer neutraler Bereich und ein eher hydrophober C-Terminus an. Der C-Terminus der Enzyme aller Klassen enthält stark konservierte Bereiche, die mögliche katalytische Domänen darstellen (Nagahashi et al., 1995; Specht et al., 1996). In dieser Kernregion befindet sich das QRRRW-Motiv, das essentiell für die Aktivität und Funktion von Chs1p, Chs2p und Chs3p aus *S. cerevisiae* ist (Cos et al., 1998). Dieses Motiv fehlt Chs2 aus *S. pombe*, was mit der Beobachtung korreliert, dass für diese Chitinsynthase keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Martin-Garcia et al., 2003). Der C-Terminus aller untersuchten Chitinsynthasen von *U. maydis* enthält die hochkonservierte Kernregion inklusive QRRRW-Motiv, was nahe legt, dass diese Moleküle Chitinsynthaseaktivität besitzen. Die sieben Chitinsynthasen (Chs1 - Chs7) und die Myosin-Chitinsynthase (Mcs1) können – wie Sequenzvergleiche mit Chitinsynthasen anderer Pilze ergaben – den bekannten Klassen I-V zugeordnet werden. Auffällig ist, dass Klasse III und V

Chitinsynthasen nur in filamentösen Pilzen gefunden wurden (Yarden und Yanofsky, 1991; Yanai et al., 1994; Borgia et al., 1996; Mellado et al., 1996a), was eine filamentspezifische Funktion dieser Chitinsynthasen nahe legt.

3.2.2 Deletion einzelner Chitinsynthasen führt zu phänotypischen Veränderungen

Da die mögliche Interaktion von Myo5 und Chitinsynthase durch Parallelen in den jeweiligen Mutantenphänotypen angedeutet werden könnte, wurden die Chitinsynthase-Deletionsstämme zunächst phänotypisch analysiert. Die Deletion einer einzelnen Chitinsynthase resultierte bisher nur in seltenen Fällen in phänotypischen Veränderungen (Yanai et al., 1994; Borgia et al., 1996; Specht et al., 1996). So führte z. B. die Deletion der Klasse III Chitinsynthasen *chs1* in *Neurospora crassa* (Yarden und Yanofsky, 1991), *chsG* in *Aspergillus fumigatus* (Mellado et al., 1996a) und *chsB* in *Aspergillus nidulans* (Yanai et al., 1994; Borgia et al., 1996) zu morphologischen Defekten, ebenso wie die Deletion der Klasse II Chitinsynthase *chs1* in *Candida albicans* (Mio et al., 1996; Munro et al., 2001). Als Ursache für das seltene Auftreten phänotypischer Veränderung von Chitinsynthase-Mutanten wird eine mögliche Redundanz dieser Enzyme diskutiert (Fujiwara et al., 2000; Munro und Gow, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit waren von *U. maydis* bereits $\Delta chs1$ -, $\Delta chs2$ -, (Gold und Kronstad, 1994), $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ - (Xoconostle-Cazares et al., 1996) und $\Delta chs5$ -Deletionsstämme (Xoconostle-Cazares et al., 1997) veröffentlicht. Im Gegensatz zu *N. crassa*, *A. fumigatus* und *A. nidulans* führte die Deletion der Klasse III Chitinsynthase *chs1* in *U. maydis* allerdings nicht zu morphologischen Veränderungen (Gold und Kronstad, 1994). Für die übrigen Deletionsstämme waren ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen veröffentlicht. Lediglich für $\Delta chs5$ -Stämme wurde eine reduzierte Pathogenität beschrieben (Xoconostle-Cazares et al., 1997). Die veröffentlichten Deletionsstämme wurden von den entsprechenden Arbeitsgruppen angefordert und auf ihre Richtigkeit überprüft. Dabei stellte sich für die $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ - und $\Delta chs5$ -Stämme heraus, dass die entsprechenden Gene noch vorhanden waren und es sich folglich nicht um Nullmutanten handelte. Es war daher notwendig, neue $\Delta chs3$ -, $\Delta chs4$ - und $\Delta chs5$ -Stämme zu generieren. Gleichzeitig wurden die noch unveröffentlichten Gene *chs7* und *mcs1* deletiert.

Überraschenderweise führte die Deletion der Klasse IV Chitinsynthase, *chs5*, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Xoconostle-Cazares et al., 1997 zu gravierenden

morphologischen Veränderungen, die durch die zusätzliche Expression von *chs5* komplementiert werden konnten. Anhand der Chitinfärbung durch WGA wurde ein geringerer Chitingehalt in den Flanken von $\Delta chs5$ -Zellen festgestellt. Da Chitin das Hauptpolymer ist, welches der Zellwand Festigkeit vermittelt (Gooday, 1994), könnte der reduzierte Chitingehalt einen Grund für die unregelmäßige Zellform darstellen. Zudem waren $\Delta chs5$ -Zellen nach Stimulation mit synthetischem Pheromon deutlich in der Konjugationshyphenbildung gestört, was vermutlich Ursache der verlangsamten Filamentbildung kompatibler Stämme auf aktivkohlehaltigem Medium war und daher auch die leicht reduzierte Virulenz bedingen könnte.

Nach Deletion der zweiten Klasse IV Chitinsynthase, *chs7*, konnten vergleichbare Zelltrennungsdefekte wie bei $\Delta chs5$ -Zellen beobachtet werden, was auf eine ähnliche Funktion beider Chitinsynthesen hindeutet. Dies ist jedoch in soweit fraglich, als es nicht möglich war, den $\Delta chs5$ -Phänotyp durch zusätzliche Expression von *chs7* zu komplementieren. $\Delta chs7$ -Zellen zeigten ebenfalls Abweichungen in der Chitinverteilung. Zudem bildeten $\Delta chs7$ -Zellen, ähnlich wie $\Delta chs5$ -Zellen und *myo5*-Mutanten, nach Stimulation mit synthetischem Pheromon signifikant weniger Konjugationshyphen aus. Im Gegensatz zu *chs5* führte die Deletion von *chs7* zu deutlichen Störungen des filamentösen Wachstums dikaryotischer Hyphen und einer stark reduzierten Virulenz.

Die Deletion beider Klasse IV Chitinsynthesen resultierte in *U. maydis* somit in morphologischen Defekten. Ähnliches konnte nach Deletion der Klasse IV Chitinsynthase *chs4* in *Exophiala dermatitidis* (Wang et al., 1999) beobachtet werden, wohingegen die Deletion der Klasse IV Chitinsynthesen *chs4* in *Neurospora crassa* (Din et al., 1996) und *chsE* von *Aspergillus nidulans* (Specht et al., 1996) unter normalen Bedingungen zu keinen Wachstumsschäden führte. Die Deletion der Klasse IV Chitinsynthase *CHS3* in *S. cerevisiae* führte ähnlich wie bei $\Delta chs5$ - und $\Delta chs7$ -Zellen zu Zelltrennungsdefekten (Shaw et al., 1991) und einer veränderten Zellwandzusammensetzung (Popolo et al., 1997), was eine spezifische Funktion von Klasse IV Chitinsynthesen andeutet.

Die beobachteten Zelltrennungsdefekte und Störungen der Konjugationshyphenbildung von $\Delta chs5$ -Zellen und $\Delta chs7$ -Zellen zeigten deutliche Parallelen zum *Myo5*-Phänotyp. Zudem waren $\Delta chs7$ -Zellen, ähnlich wie *myo5*-Mutanten, stark in ihrer Virulenz beeinträchtigt. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass *Myo5* an der Lokalisation von *Chs5* und *Chs7* beteiligt ist.

Die Deletion der Klasse V Chitinsynthase *chs6*, in *U. maydis* sowie die Deletion der Myosin-Chitinsynthase *mcs1*, deren Chitinsynthase-Domäne ebenfalls der Klasse V zugeordnet werden kann, resultierte in ähnlichen Defekten. Sowohl kompatible $\Delta chs6$ - als auch $\Delta mcs1$ -Stämme waren in der Lage, auf aktivkohlehaltigem Medium Filamente zu bilden. Nach Infektion der Pflanzen mit kompatiblen $\Delta chs6$ - bzw. $\Delta mcs1$ -Stämmen sowie mit dem solopathogenen Stamm SG200 $\Delta mcs1$ konnten allerdings weder Anthocyan- noch Tumorbildung beobachtet werden, da $\Delta chs6$ - und $\Delta mcs1$ -Hyphen vermutlich nicht in der Lage waren, in die Pflanze einzudringen. Die für $\Delta chs6$ -Zellen beobachteten Defekte bestätigen jüngst unveröffentlichte Ergebnisse (Garcerá-Teruel et al., 2004).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in *U. maydis* schon die Deletion einer einzigen der vier Chitinsynthasen Chs5, Chs6, Chs7 oder Mcs1 zu morphologischen Veränderungen bzw. Pathogenitätsverlusten führte. Dies spricht gegen die bislang diskutierte Redundanz von Chitinsynthasen und deutet an, dass zumindest diese vier Chitinsynthasen während des Lebenszyklus von *U. maydis* unterschiedliche Funktionen ausüben könnten. Die Deletion von *chs7* und *chs5* führte ähnlich wie bei $\Delta myo5$ -Zellen zu Zelltrennungsdefekten, was eine mögliche Interaktion des Motors mit den Chitinsynthasen andeutet.

3.2.3 Nikkomycin Z-Hypersensitivität einiger Deletionsstämme deutet polare Chitinsynthase-Lokalisation an

Da *myo5^{ts}*-Mutanten eine deutliche Hypersensitivität gegenüber dem Chitinsynthase-spezifischen Inhibitor, Nikkomycin Z (Debono und Gordee, 1994; Kim et al., 2002), aufwiesen, war es denkbar, dass auch die Deletion der möglichen „Cargos“ von Myo5, d. h. der Chitinsynthasen, in einer erhöhten Sensitivität der Zellen resultieren kann. In *U. maydis* führt Nikkomycin Z zur Aufschwellung der Knospenspitze haploider Sporidien (G. Steinberg, unveröffentlicht), was andeutet, dass polar lokalisierende Chitinsynthasen gehemmt werden. Daher könnte die Hypersensitivität eines Chitinsynthase-Deletionsstamms gegenüber Nikkomycin Z zudem für eine polare Lokalisation der deletierten Chitinsynthase sprechen.

In den durchgeführten Wachstumstests zeigten $\Delta chs2$ -, $\Delta chs3$ - und $\Delta chs4$ -Zellen die gleiche Sensitivität wie der Wildtyp. Dies bedeutet, dass die Hemmung vermutlich polarer Chitinsynthasen durch Nikkomycin Z und die zusätzliche Deletion der entsprechenden Gene *chs2*, *chs3* und *chs4* das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigt. Dies könnte anhand der Chs3GFP und Chs4GFP *in vivo* Lokalisationen in Septen erklärt werden (vgl.

3.2.4). Im Gegensatz hierzu waren die Stämme SG1 (*a2 b2Δchs1*), FB2Δchs5, FB2Δchs6, FB2Δchs7 und FB2Δmcs1 gegenüber Nikkomycin Z deutlich sensitiver als der Wildtypstamm FB2. Diese Hypersensitivität legt die polare Verteilung der entsprechenden Chitinsynthasen nahe, welche für Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 durch *in vivo* Lokalisationen bestätigt werden konnte. Die Tatsache, dass mindestens vier Chitinsynthasen in *U. maydis* polar in der Spitze haploider Sporidien lokalisieren, deutet an, dass diese Enzyme ähnliche oder miteinander verknüpfte Funktionen in der Knospenspitze ausüben, und könnte erklären, warum *U. maydis* sieben Chitinsynthasen und eine Myosin-Chitinsynthase besitzt.

Da ähnliche wie *myo5^{ts}*-Zellen auch *Δchs1*-, *Δchs5*-, *Δchs6*-, *Δchs7*- und *Δmcs1*-Zellen eine starke Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z zeigten, weisen die Ergebnisse zudem auf eine Interaktion dieser Chitinsynthasen mit Myo5 hin.

3.2.4 Lokalisation der polaren Chitinsynthasen ist aktinabhängig

Zur Prüfung des Einflusses von Myo5 auf die Chitinsynthase-Lokalisation, wurden GFP- bzw. YFP-Chitinsynthase-Fusionsproteine hergestellt, und es konnten Chs3, Chs4, Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 lokalisiert werden. Für Chs1GFP und Chs2GFP konnte weder in Sporidien noch in Konjugationshyphen und dikaryotischen Hyphen eine spezifische Lokalisation beobachtet werden, obwohl Transkripte von *chs1* und *chs2* in haploiden Sporidien und in Kreuzungen haploider Sporidien auf aktivkohlehaltigem Medium nachgewiesen wurden (Gold und Kronstad, 1994). Die Gründe für diese negativen Ergebnisse müssen in späteren Arbeiten geklärt werden.

Die übrigen Fusionsproteine Chs3GFP, Chs4GFP, Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP lokalisierten an Septen haploider Sporidien und Hyphen. Eine Lokalisation im Trennungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle ist auch für die Klasse II Chitinsynthase Chs2p aus *S. cerevisiae* und Chs2 aus *S. pombe* bekannt (Chuang und Schekman, 1996; Ding et al., 2000; Roh et al., 2002; Tahirovic et al., 2003). Für Letztere konnte jedoch keine Chitinsynthaseaktivität nachgewiesen werden (Martin-Garcia et al., 2003). In *S. cerevisiae* ist Chs2p essentiell für die Septenbildung (Silverman et al., 1988), während die gewonnenen Lokalisationsdaten andeuten, dass diese wichtige Funktion in *U. maydis* vermutlich von den sechs Chitinsynthasen Chs3, Chs4, Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 übernommen wird. Chs5GFP, Chs6GFP, Chs7YFP und Mcs1YFP lokalisierten zusätzlich noch polar in den Spitzen von haploiden Sporidien, Konjugationshyphen und

dikaryotischen Hyphen bzw. Filamenten. Für Chs3p aus *S. cerevisiae* ist eine polare Lokalisation in Zellen ohne Knospe gezeigt worden, die allerdings in knospenden Zellen nicht mehr beobachtet werden konnte (Santos und Snyder, 1997). Des Weiteren existierten indirekte Hinweise für eine Spitzenlokalisation von Chitinsynthasen (Archer, 1977; Braun und Calderone, 1978).

Da ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der möglichen Interaktion von Myo5 und Chitinsynthasen und deren Bedeutung für das polare Wachstum lag, wurde nur die Lokalisation der polaren Chitinsynthasen Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 in Abhängigkeit des Mikrotubuli- und Aktin-Cytoskeletts weiterführend untersucht. Bei den hierzu durchgeführten Inhibitorversuchen führte die Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts durch Benomyl in *U. maydis* zu keinen signifikanten Verteilungsproblemen der untersuchten Chitinsynthasen. Nach zwei- bis dreistündiger Behandlung mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A zeigte sich allerdings bei allen vier untersuchten Chitinsynthasen eine Fehlverteilung, die sich in einer Reduktion der Signalstärke in der Knospe und in einer gleichmäßigen Verteilung der GFP- bzw. YFP-Fusionsproteine in der Plasmamembran äußerte. Daher ist anzunehmen, dass der polaren Spitzenlokalisation der Chitinsynthasen ein aktinabhängiger Transportprozess zu Grunde liegt. Durch ihre Transmembrandomänen sind Chitinsynthasen in der Plasmamembran verankert. Sie könnten in Anlehnung an das Fluid-Mosaik-Modell (Singer und Nicholson, 1972) durch die Membran diffundieren und sich so gleichmäßig verteilen. Aus *S. cerevisiae* liegen deutliche Hinweise für eine Diffusion von Chs2p vor (Roh et al., 2002). Eine kontinuierliche polare Anlieferung kann jedoch der Diffusion entgegenwirken und eine Konzentration der Chitinsynthasen in der Knospenspitze gewährleisten. Da nach Störung der polaren Chitinsynthase-Anlieferung durch Lat A stets noch Signale in der Membran vorhanden waren, ist zudem eine Beeinträchtigung der Endocytose denkbar. Die Endocytose von Chs1p, Chs2p und Chs3p konnte bereits in *S. cerevisiae* gezeigt werden (Chuang und Schekman, 1996; Ziman et al., 1996; Valdivia et al., 2002). Chs2p wird nach erfolgter Endocytose in der Vakuole durch die Pep4p-Protease degradiert (Chuang und Schekman, 1996), während Chs1p und Chs3p vermutlich einen endocytotischen Recyclingprozess durchlaufen (Ziman et al., 1996; Holthuis et al., 1998) und sich in spezialisierten Vesikeln, auch Chitosomen genannt, befinden.

In *S. cerevisiae* ist die Endocytose aktinabhängig (Kubler und Riezman, 1993; Ayscough et al., 1997; Geli und Riezman, 1998; Pruyne und Bretscher, 2000), und eigene Experimente belegen eine Beteiligung von Aktin an der Endocytose in *U. maydis* (nicht gezeigt). Unter

der Annahme, dass die Regulation der Aktivität und der räumlichen Verteilung der Chitinsynthasen auch in *U. maydis* u. a. durch Endocytose erfolgt, könnte eine mögliche Hemmung der Endocytose durch Lat A die noch in der Membran vorhandenen Signale erklären.

Im Ergebnis kann festgehalten werden, dass die Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 aktinabhängig ist. Über den Einfluss des Cytoskeletts auf die Lokalisation von Chitinsynthasen ist bislang wenig bekannt. Lediglich für die Chitinsynthase Chs3p aus *S. cerevisiae* liegen Ergebnisse vor, die eine Beteiligung des Klasse V Myosins Myo2p an deren Lokalisation zeigen. Für das Klasse II Myosin Myo1p aus *S. cerevisiae* wird der Transport von Chs2p diskutiert (Brown, 1997). Eine Beteiligung von Myosinen an der Chitinsynthase-Lokalisation wird auch durch die Existenz von Myosin-Chitinsynthasen nahe gelegt. Zur Klärung der Frage, ob Myo5 der aktinabhängige Motor ist, der für die Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 verantwortlich ist, wurde die Lokalisation dieser Chitinsynthasen in *myo5^{ts}*-Zellen bei restriktiver Temperatur untersucht.

3.2.5 Eine Temperaturerhöhung auf 28°C beeinträchtigt das Aktin-Cytoskelett nicht

Die Aktinabhängigkeit der Chitinsynthase-Lokalisation bestätigte die Hypothese, dass Myo5 an dem Transport polarer Chitinsynthase beteiligt sein kann. Um tiefere Einblicke zu erhalten, sollte die Lokalisation in *myo5^{ts}*-Zellen bei restriktiver Temperatur untersucht werden. Da eine temporäre Beeinträchtigung des Aktin-Cytoskeletts durch Temperaturerhöhung in *S. cerevisiae* bekannt ist (Lillie und Brown, 1994; Desrivieres et al., 1998) und dies nach einstündiger Temperaturerhöhung von 20°C auf 34°C bei *U. maydis* vermutlich auch der Fall ist (G. Steinberg, pers. Mitteilung), wurden Bedingungen gesucht, bei denen eine Funktionsstörung von Myo5 erreicht wird, während gleichzeitig Defekte des Aktin-Cytoskeletts ausgeschlossen werden können. Es zeigte sich zunächst, dass schon eine Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C für eine Ausbildung des Phänotyps in *myo5^{ts}*-Zellen ausreicht. Um eine Störung des Aktin-Cytoskeletts unter diesen Bedingungen ausschließen zu können, sollte ein *in vivo* Aktinmarker etabliert werden. Da in *Arabidopsis thaliana* durch das Fimbrin AtFim1 das dynamische Aktinnetzwerk lokalisiert werden konnte (Kovar et al., 2001), wurde das entsprechende Homolog von *U. maydis*, Fim1, ausgewählt.

Fim1 aus *U. maydis* zeigt 62% Identität zu den Fimbrinen Sac6p aus *S. cerevisiae* und 61% zu Fim1 aus *S. pombe* sowie eine für Fimbrine typische Domänenstruktur. Durch das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Fim1GFP-Fusionsprotein konnten motile Flecken im Cytoplasma angefärbt werden. Diese fleckigen Strukturen lokalisierten ähnlich wie sog. „actin patches“ (Adams und Pringle, 1984), die auch für *U. maydis* bekannt sind (Banuett und Herskowitz, 2002), und waren sensitiv gegenüber Latrunculin A. Auch die Bewegungsgeschwindigkeit der angefärbten Flecken deckte sich mit der für „actin patches“ bekannten Motilität von durchschnittlich 0,28 $\mu\text{m/s}$ (Doyle und Botstein, 1996; Waddle et al., 1996), was nahe legt, dass Fim1GFP „actin patches“ in *U. maydis* anfärbt. Weder durch die Aktin *in vivo* Lokalisation mittels Fim1GFP noch durch Immunfluoreszenz (G. Steinberg) konnte eine temporäre Beeinträchtigung des Aktin-Cytoskeletts nach Temperaturshift von 20°C auf 28°C festgestellt werden. Auch die Motilität der durch Fim1GFP angefärbten Strukturen blieb nach Temperaturerhöhung erhalten, was für eine intakte Aktinstruktur spricht. Somit konnten diese Bedingungen für die Untersuchung der Chitinsynthasen-Lokalisation in *myo5^{ts}*-Zellen verwendet werden.

3.2.6 Chs7-Lokalisation ist in *myo5^{ts}*-Mutanten gestört

Ausgehend von den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Beobachtungen, die eine Störung des Aktin-Cytoskeletts durch Temperaturerhöhung auf 28°C ausschließen, wurde das Lokalisationsverhalten von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 nach ein- und dreistündiger Temperaturerhöhung auf 28°C in *myo5^{ts}*-Zellen untersucht. Dabei konnte nur für Chs7YFP eine Fehlverteilung festgestellt werden. Die Anzahl der knospenden Zellen, die ein polares Chs7YFP-Signal zeigten, reduzierte sich von 86,7% bei 20°C auf 41,3% nach einer Stunde bei 28°C. Zellen ohne polares Signal zeigten eine hohe cytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz. Dies bedeutet, dass Myo5 direkt oder indirekt an der polaren Lokalisation von Chs7 in der Knospenspitze beteiligt ist. Ein weiteres Indiz für eine Interaktion von Myo5 und Chs7 sind die Parallelen im Phänotyp. Sowohl *myo5^{ts}*-Mutanten als auch *chs7*-Deletionsmutanten zeigen Zelltrennungsdefekte, Defekte im Hyphenwachstum und eine reduzierte Pathogenität. Die vorhandenen Unterschiede in der Ausprägung der Phänotypen können jedoch durch Funktionen von Myo5 erklärt werden, die über den Chitinsynthase-Transport hinaus gehen.

Eine Fehlverteilung von Chs5, Chs6 und Mcs1 konnte in *myo5^{ts}*-Zellen nicht beobachtet werden. Hierfür kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen kann dies experimentelle

Ursachen haben, da es denkbar ist, dass eine Fehlverteilung dieser membranständigeren Chitinsynthasen nach einstündiger Temperaturerhöhung noch nicht zu erkennen ist und unter der Annahme eines „Backup“-Mechanismus (vgl. 3.2.7) zu späteren Zeitpunkten überlagert wird. Zum anderen könnten andere Myosine für die aktinabhängige Lokalisation von Chs5, Chs6 und Mcs1 verantwortlich sein. Die genomische Sequenz von *U. maydis* kodiert neben Myo5 für ein Klasse I Myosin, Myo1, und ein Klasse II Myosin, Myo2. Insbesondere vor dem Hintergrund der Erkenntnisse über die Funktionen der Klasse I und II Myosine im Membran- und Vesikeltransport ist es denkbar, dass auch diese Myosine an Chitinsynthese-Verteilungsprozessen in *U. maydis* beteiligt sind. Klasse I Myosine sind für den endocytotischen und exocytotischen Membrantransport (Yamashita und May, 1998; Neuhaus und Soldati, 2000) sowie für die Zellbewegung, die Zellentwicklung und das Zellwachstum in verschiedenen Organismen von Bedeutung; (Übersicht siehe Coluccio, 1997; Mermall et al., 1998). Zur Zeit ist allerdings noch unklar, ob Klasse I Myosine direkt mit sekretorischen und endocytotischen Vesikel assoziiert sind und diese entlang von Aktinfilamenten bewegen oder ob sie an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind und somit indirekt für den aktinabhängigen Vesikeltransport verantwortlich sind (Übersicht siehe Tuxworth und Titus, 2000). Für Klasse II Myosine konnte neben der Rolle bei der Cytokinese und Zelltrennung (Mulvihill und Hyams, 2003; Tolliday et al., 2003), die Assoziation mit Golgi-Membranen gezeigt werden, was eine Funktion der Klasse II Myosine im Golgi-Transport andeutet (Ikonen et al., 1997; Musch et al., 1997). Ein Myosin II abhängiger Vesikeltransport wurde in Muschel-Oocyten beschrieben (DePina und Langford, 1999; Wollert et al., 2001), und weitere Experimente lassen auf einen aktiven Vesikeltransport durch Myosin II schließen (DeGiorgis et al., 2002; Neco et al., 2002). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist auch der Transport von Chitosomen durch Klasse I und II Myosine denkbar.

Indirekte Anzeichen für einen Zusammenhang von Myosinen der Klasse I und II und dem Zellwandaufbau bzw. Zellwandbestandteilen existieren aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*. *S. cerevisiae* Doppelmутanten der Klasse I Myosine *MYO3* und *MYO5* zeigten Störungen in der Chitin- und Zellwandablagerung (Goodson et al., 1996), und *Δmyo1*-Zellen von *S. pombe* (Toya et al., 2001) und *myo5*-Mutanten von *C. albicans* (Oberholzer et al., 2002) wiesen eine abnormale Ablagerung von Zellwandmaterial auf. Ebenso führten Mutationen des Klasse II Myosins, *MYO1*, in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten Chitinsynthese (Rodriguez-Medina et al., 1998; Cruz et al., 2000), sowie zu einer gestörten Chitinablagerung und Zellwandorganisation (Rodriguez und Paterson, 1990). Die

beschriebenen Einflüsse von Klasse I und II Myosinen auf die Zellwandzusammensetzung können sekundäre Effekte darstellen, da z. B. für *myo3/myo5*-Doppelmutanten auch der Verlust der Aktinorganisation gezeigt wurde (Goodson et al., 1996).

Es ist ebenfalls denkbar, dass die aktinabhängige Lokalisation der Myosin-Chitinsynthase, Mcs1, auf die Motoraktivität der eigenen putativen Myosin-Motordomäne zurückgeht. Wäre dies der Fall, könnte Mcs1 auch an der Lokalisation anderer Chitinsynthasen beteiligt sein. Die putative Motordomäne von Mcs1 enthält 51,3% der in Klasse I, II und V Myosinen konservierten Aminosäuren und einen „P-loop“. Verschiedene andere Motive, die vermutlich Einfluss auf die Aktivität einer Myosin-Motordomäne haben, sind ebenfalls in der Mcs1-Sequenz zu finden, weichen aber teilweise von den bekannten Konsensussequenzen ab. In zellbiologische Untersuchungen konnte die Motilität eines Mcs1GFP-Fusionsproteins beobachtet werden (nicht gezeigt), was auf eine mögliche Funktionalität der Myosin-Motordomäne hinweisen könnte, aber auch auf einen passiven Transport zurückgehen könnte. Anhand der durchgeführten Sequenzanalysen und zellbiologischen Beobachtungen konnte im Rahmen dieser Arbeit keine klare Aussage über die Funktionalität der Mcs1-Motordomäne getroffen werden. In *Aspergillus nidulans* konnte gezeigt werden, dass die potentielle Myosin-Motordomäne der Myosin-Chitinsynthase CsmA für die Funktion des Enzyms von Bedeutung ist, da eine alleinige Expression der Chitinsynthase-Domäne nicht zu einer Komplementation des CsmA-Deletionsphänotyps führte (Horiuchi et al., 1999). Ob dies allerdings auf die Motoraktivität von CsmA zurückgeht ist unklar.

Bei den durchgeführten Lokalisationsstudien der Chitinsynthasen in *myo5^{ts}*-Zellen zeigte sich überraschenderweise, dass die nach einstündiger Inkubation bei restriktiver Temperatur beobachtete Fehlverteilung von Chs7 nach weiterer Inkubation für zwei Stunden nicht mehr zu beobachten war. Nach drei Stunden bei 28°C zeigten wieder $78,9 \pm 5,5\%$ der Zellen ein polares Signal. Eine mögliche Erklärung dieses Effekts könnte sein, dass andere Motormoleküle die Transportaufgaben von Myo5 übernehmen. Alternativ ist es allerdings auch denkbar, dass Myo5 selbst für dieses Phänomen verantwortlich ist, wenn nämlich trotz Temperaturerhöhung das Motormolekül nur kurzzeitig in seiner Funktion gestört würde.

3.2.7 Aktinabhängige GFPMyo5^{ts}-Repolarisierung nach Temperaturerhöhung

Zur Untersuchung der möglichen Ursache der Repolarisierung von Chs7YFP in *myo5^{ts}*-Zellen wurde zunächst das Verhalten des Myo5^{ts} Proteins nach Temperaturerhöhung näher analysiert. Dabei zeigte ein GFPMyo5^{ts}-Fusionsprotein nach Temperaturerhöhung ein ähnliches Lokalisationsmuster wie Chs7YFP, d. h. nach einer Stunde wiesen signifikant weniger Zellen mit Knospe ein polares GFPMyo5-Signal auf, nach drei Stunden jedoch wieder vergleichbar viele Zellen wie bei 20°C.

Da eine Aktinabhängigkeit dieser Repolarisierung von GFPMyo5^{ts} gezeigt werden konnte, ist es denkbar, dass die Repolarisierung von Myo5 – und damit eventuell auch die von Chs7 – auf die Myo5-abhängige Motoraktivität zurückgeht. Sie könnte allerdings auch das Ergebnis eines aktinabhängigen passiven Transports sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht abschließend geklärt werden, welcher der beiden genannten Prozesse der Repolarisierung tatsächlich zu Grunde liegt. Eine auf Myo5 zurückgehende Transportaktivität erscheint allerdings unwahrscheinlich, da *myo5^{ts}*-Zellen nach längerer Inkubation bei 28°C die für Δ *myo5*-Zellen charakteristischen Defekte zeigen. Aus diesem Grund ist das Vorliegen eines anderen Transportmechanismus wahrscheinlich, der im Folgenden modellhaft dargestellt wird (vgl. Abb. 46):

Unter permissiven Bedingungen ist Myo5 am Transport von Chs7YFP beteiligt. Nach Temperaturerhöhung kommt es zur Konformationsänderung des Myo5 Moleküls und somit zum Verlust der Fähigkeit, Aktin zu binden. Dies ist aufgrund der die Temperatursensitivität vermittelnden Mutation in der potentiellen Aktinbindungsregion sehr wahrscheinlich. Bedingt durch die Konformationsänderung des N-Terminus ist Myo5 noch immer in der Lage, C-terminal Chs7YFP- bzw. Chs7YFP-haltige Chitosomen direkt oder indirekt zu binden. In der Zeit zwischen einer und drei Stunden nach Temperaturerhöhung etabliert sich ein alternativer aktinabhängiger Transportmechanismus. So könnte z. B. ein anderes Myosin (MyoX) an Chs7YFP-haltige Chitosomen binden und Chs7YFP und damit auch passiv das an die Chitosomen gebundene Myo5 in die Knospenspitze transportieren. Dieses Modell wird gestützt durch die Tatsache, dass eine erhöhte Chitinsynthese bzw. eine Translokation der Chitinsynthasen als Stressantwort bereits mehrfach in der Literatur diskutiert wurde (de Nobel et al., 2000; Valdivia und Schekman, 2003).

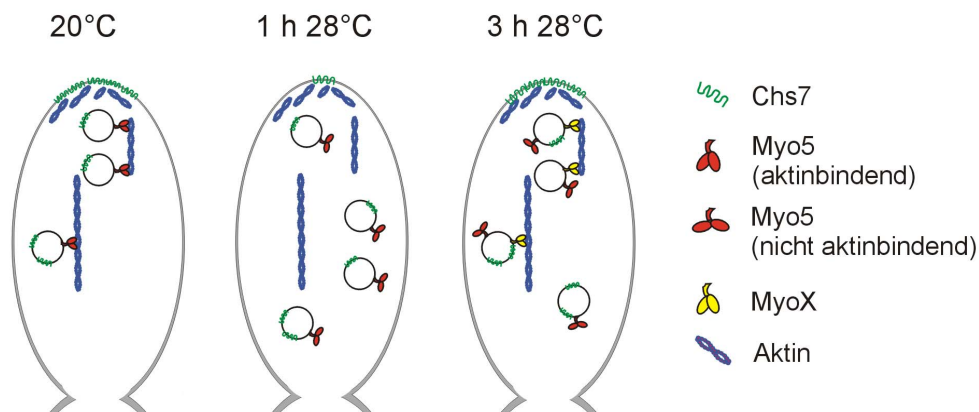


Abb. 46: Modell des Transports von Chs7 und der Repolarisierung von Chs7 und Myo5 in *myo5^{ts}*-Zellen.

Bei 20°C lokalisiert Chs7 Myo5-abhängig in der Spitze von Zellen mit kleiner Knospe. Durch Temperaturerhöhung kommt es in *Myo5^{ts}* zu einer Konformationsänderung, die die Aktinbindung von Myo5 verhindert. Ein anderes Myosin (MyoX) ist dann in der Lage, den Chs7-Transport zu übernehmen und transportiert damit auch an Chs7-Chitosomen gebundenes Myo5 in die Spitze.

Für *myo1*-Mutanten von *S. cerevisiae* wird die Induktion eines „stress response“ Signalwegs postuliert, der zu einem erhöhten Chitingehalt der Zellwände als ausgleichende Reaktion führt (Cruz et al., 2000). Im Rahmen dieser „stress response“ Chitinsynthese existieren Hinweise auf einen alternativen Transportmechanismus für Chs3p (Osmond et al., 1999). Dies könnte auch in *U. maydis* der Fall sein. Für das Modell spricht darüber hinaus, dass nach einer Stunde noch immer einige *myo5^{ts}*-Zellen ein polares Chs7YFP Signal zeigen. Schließlich wird die vorgeschlagene Backup- bzw. Funktionsübernahme-Theorie durch die Beobachtung bekräftigt, dass mit einem kreuzreaktiven Chs2p-Antikörper aus *S. cerevisiae* in $\Delta myo5$ -Zellen keine Chitinsynthese-Fehlverteilung festgestellt wurde.

Als für die vorgeschlagene Funktionsübernahme verantwortliches Myosin (MyoX), erscheinen das im Genom von *U. maydis* enthaltene Klasse I Myosin, Myo1, oder das Klasse II Myosin, Myo2, wahrscheinlich. Für die Myosin-Chitinsynthese, Mcs1, konnte im Rahmen dieser Arbeit zwar eine aktinabhängige Lokalisation gezeigt werden, die Funktionalität der Myosin-Motordomäne ist jedoch fraglich (vgl. 3.2.6), so dass Funktionsübernahme von Myo5 durch Mcs1 unwahrscheinlich ist. Für die Alternativen Myo2 und Myo1 spricht die Tatsache, dass sowohl Klasse I und II Myosine in Zusammenhang mit Chitinablagerungen in der Zellwand und Zellwandzusammensetzungen als auch mit Vesikel- und Membrantransport gebracht werden (siehe 3.2.6).

3.2.8 Chs7-Fehlverteilung kann nicht alleinige Ursache der Morphologie-Defekte von *myo5^{ts}*-Mutanten sein

myo5-Mutanten zeigten deutliche Morphologiedefekte und waren stark in ihrer Pathogenität reduziert. Es wurde untersucht, ob diesen Defekten eine Chitinsynthase-Fehlverteilung zu Grunde liegt. Die Lokalisation von Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 war aktinabhängig, jedoch konnte nur eine Beteiligung von Myo5 an der Chs7-Verteilung festgestellt werden. Δ *chs7*-Zellen zeigten zudem ähnlich wie *myo5*-Mutanten eine Hypersensitivität gegenüber Nikkomycin Z, Störungen in der Ausbildung von Konjugationshyphen und im Wachstum dikaryotischer Hyphen sowie eine deutlich reduzierte Pathogenität. Diese Parallelen der Phänotypen legen nahe, dass Myo5 an dem Chs7-Transport beteiligt ist. Der moderate Δ *chs7*-Phänotyp in haploiden Sporidien deckt sich allerdings nicht mit dem gravierenden Phänotyp der *myo5*-Mutanten, weshalb es denkbar ist, dass Myo5 zumindest in haploiden Sporidien zusätzlich am Transport anderer Moleküle beteiligt ist. So ist aufgrund der ähnlichen Morphologiedefekte von Δ *myo5*- und Δ *chs5*-Sporidien und der ebenso in Δ *chs5*-Zellen gestörten Konjugationshyphenbildung auch eine Interaktion von Myo5 mit der zweiten Klasse IV Chitinsynthase, Chs5, vorstellbar. Eine Chs5-Fehlverteilung in *myo5^{ts}*-Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden, was experimentelle Ursachen haben kann (vgl. 3.2.6). Da in Δ *myo52*-Zellen von *S. pombe* die putative α -Glucan-Synthase Mok1 fehlverteilt ist (Win et al., 2001), ist es zudem denkbar, dass auch Myo5 an dem Transport von Glucan-Synthasen beteiligt sein kann. Auch eine gestörte Verteilung anderer, in Zusammenhang mit der Zellwandbiogenese stehender Enzyme ist in *myo5^{ts}*-Zellen denkbar und könnte Ursache der Nikkomycin Z-Hypersensitivität sein. So führte z. B. die Deletion der Endo- β -1,3-Glucanase *BGL2* in *S. cerevisiae* zu einer leicht reduzierten Wachstumsrate bei Anwesenheit von Nikkomycin Z (Kalebina et al., 2003). Auch Mutationen in dem Gen *FKSI*, das für die katalytische Untereinheit einer β -1,3-Glucan-Synthase kodiert (Douglas et al., 1994), und die Deletion von *GGPI*, welches für eine β -1,3-Glucanosyltransferase kodiert (Popolo et al., 1997), führten zu einer Hypersensitivität der Hefezellen gegenüber Nikkomycin Z.

3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myo5 für verschiedene Stadien im Lebenszyklus von *Ustilago maydis* von enormer Bedeutung ist, und zwar insbesondere für die Zell-Zellerkennung im Kreuzungsprozess und die Pathogenität. Als mögliche „Cargos“ von Myo5 wurden sieben Chitinsynthasen und eine Myosin-Chitinsynthase von *U. maydis* untersucht und in *myo5^{ts}*-Zellen lokalisiert. Dabei konnte nach einstündigem Temperaturshift eine Fehlverteilung von Chs7 festgestellt werden, was nahe legt, dass Myo5 an der Lokalisation von Chs7 beteiligt ist. Diese mögliche Interaktion zwischen Myo5 und Chs7 könnte auch durch die Parallelen der Phänotypen eine Entsprechung finden. Δ *chs7*-Zellen wiesen ebenfalls Zelltrennungsdefekte auf, waren in der Konjugationshyphenbildung gestört sowie in ihrer Pathogenität reduziert.

Die beobachtete Repolarisierung von Chs7YFP wirft Fragen auf. Durch Untersuchungen von GFPMyo5^{ts} nach Temperaturshift konnte Myo5 als Ursache für dieses Repolarisierungsphänomen nicht ausgeschlossen werden. Denkbar ist zudem ein alternativer aktinabhängiger Transportmechanismus. In weiterführenden Experimenten müsste daher die Lokalisation von Chs7 in Δ *myo5*-Zellen näher untersucht werden. Zeigt sich dabei in der Deletionsmutante keine Fehlverteilung von Chs7, so wäre dies als ein weiteres Indiz für einen alternativen Transportprozess zu werten. Da durch die durchgeführten Versuche eine Beteiligung von Myo5 an der Lokalisation von Chs5, Chs6 und Mcs1 nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten diese Chitinsynthasen ebenfalls in Δ *myo5*-Zellen lokalisiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass insbesondere *myo5*- und *chs5*-Mutanten sehr ähnliche Phänotypen aufweisen, wäre auch eine Interaktion dieser Moleküle denkbar.

Zur Klärung der Frage, ob die Myosin-Motordomäne von Mcs1 funktionell ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Sequenzanalysen und zellbiologische Untersuchungen durchgeführt. Eine eindeutige Aussage ist anhand dieser Ergebnisse allerdings nicht möglich. Aufschluss über die mögliche Funktionalität könnte ein ATPase- und ein Aktinbindungsassay liefern. In ersten Experimenten konnte die Mcs1-Motordomäne mit und ohne Linkerregion in *U. maydis* überexprimiert sowie aufgereinigt werden, und steht nun für biochemische Analysen zur Verfügung.

4 Materialien und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendete Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Fluka, Merck, Riedel-de-Häen, Roth und Sigma bezogen.

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel et al., 1987 und Sambrook et al., 1989 hergestellt, Einzelheiten dazu siehe Brachmann, 2001. Spezielle Puffer, Lösungen und Medien sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche, mit den Ausnahmen Taq-DNA-Polymerase (Laborpräparation A. Brachmann und G. Weinzierl), Herkulase (Stratagene), *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Qiagen oder Stratagene).

Verwendete Kits und sonstiges Material

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: JETsorb (Genomed) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick PCR Purification Kit (Genomed) zur Aufreinigung von PCR Produkten, JETquick General DNA Clean-up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (New England Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, DIG High Prime (Roche) und PCR-DIG-labeling Mix (Roche) zur Dioxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten, Microspin S-300 und S-200 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARK Scientific, Metabion und MWG synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

Tabelle 10: Oligonukleotide, die für die Bestimmung des 3'-Gen-Endes mit der λ gt10 cDNA-Bank verwendet wurden.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
owi 13	CCGGGCACCGTAGAAGAA	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs1</i>
owi 14	TTTGTGCTTGCCTCGGC	
owi 15	GCGGAAAGCTGACAGTCC	
owi 16	GACGTAGGCACCAAACCG	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs2</i>
owi 17	GGGGGAGGTCAAAGTAAC	
owi 18	TGAGGCGACGAGCGGATT	
owi 19	CCCCAAGCGGTTTGAAG	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs5</i>
owi 20	CCCAGATCATGGGTCTC	
owi 21	AGGCGTTGGTACGTTGGG	
owi 22	TTCCGGATCCTCACCACG	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs3</i>
owi 23	ATGTTCCCGAGGGACTCC	
owi 24	GGTGCAAAGGATCGCACG	
owi 25	AACAAGGCGCCCAAAGCC	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs4</i>
owi 26	CATTTGCTTGCAGCCAC	
owi 27	CCCATCATCCTGAACAGCG	
owi 28	TGCCTCAATCCGCCGCAT	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs5</i>
owi 29	AGGTGACGCGCGAGTACA	
owi 30	GCCCCACTTGTATCGTC	
owi 31	GTACGGTCAGCCGATGCT	Bestimmung des 3'-Endes von <i>mcs1</i>
owi 32	CTGGTCGCTCTTCTTCC	
owi 33	TCGATCGAGGTGGCGTAC	
owi 34	AGAAGCCAGCACACTCGC	Bestimmung des 3'-Endes von <i>chs6</i>
owi 35	GGCAGTACATTGGCTGGC	
owi 36	AGGTCGAAACAGGTCGCG	

Tabelle 11: Oligonukleotide, die für die Herstellung von Deletionsmutanten verwendet wurden.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
owi 39	CACGGCCTGAGTGGCCGAGGGGCGCGCATTATT	Klonierung von pCRTOPOMcs1-KO-H
owi 40	GCGGTGGACGAAATCGGT	
owi 41	GCCCTTCAAGCTGCCAAG	
owi 42	GTGGGCCATCTAGGCCGCGACTTTGCGTACCAG	
owi 43	CACGGCCTGAGTGGCCTACGACGAGACACTGCCC	Klonierung von pCRTOPOChs7-KO-H
owi 44	ACACGCACGCGACAAGCA	
owi 45	AAAGGGGTTGGCTGGCGT	
owi 46	GTGGGCCATCTAGGCCGAGGTGGCGCCTCTGTA	
oda 1	GTGCAAGCACAAAGCGTCG	Klonierung von pCRTOPOChs3-KO-B
oda 2	CACGGCCTGAGTGGCCGAGATGGGAGACGTATG	
oda 13	GTGGGCCATCTAGGCCTCCTTCTCCGCATACGCC	
oda 15	CTACAGGCACTCGACCAG	
oda 5	GTCTCCAGCCAGACAGG	Klonierung von pCRTOPOChs4-KO-H
oda 6	CACGGCCTGAGTGGCCGGCGGCTATGGATAGCC	
oda 7	GTTGACGTGGCTCGGAAG	
oda 8	GTGGGCCATCTAGGCCCTTGAAGCTGGTGGAGATG	
oda 9	GCAACACGAGCCTGCGTC	Klonierung von pCRTOPOChs5-KO-B
oda 10	CACGGCCTGAGTGGCCGGTTCTCTGAAACGAGATGCC	
oda 11	GGGGTAAAGTGGCATGGC	
oda 12	GTGGGCCATCTAGGCCCAAGCATCGCAGTGGCG	

Tabelle 12: Oligonukleotide, die für die Klonierung von GFP- bzw. YFP-Fusionsproteinen verwendet wurden.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
owi 67	CATATGGGCTCTGTTACGTGGCGT	Klonierung von pSLB-Fim1-GFP-hom
owi 68	CCATGGCGCCCTGGATAGCCATCAACGATC	
owi 69	CGGTGGACATGGCAGTC	
owi 70	AAGCTTACACCCGCCAATCCTACG	
owi 176	GAATTCTGCTGCGAGCTGCGAATC	Klonierung von pSLB-Chs1-GFP-hom
owi 177	CTGCAGGACGCTGATGCGTGACTC	
owi 178	AAGCTTGGCATACGCTGTTCAACC	
owi 179	CCATGGCGCCGGTCTTTTCGGAAGCACCG	
owi 194	AAGCTTGCAGCTGGCTACACCATC	Klonierung von pSLB-Chs2-GFP-hom
owi 195	CCATGGCGCCGTGTCCGAAGAGGCGCA	
owi 196	GAATTCCTTCCTTCAACTGGCGTG	
owi 197	CTGCAGTATGGCTGCCTCGTCCTC	
owi 180	GAATTCCTCCGCATACGCCTCACG	Klonierung von pSLB-Chs3-GFP-hom
owi 181	CTGCAGCACGCGATATGTGCGTGC	
owi 182	AAGCTTATGGTTGCCGCCGTCTTG	
owi 183	CCATGGCGCCACCGTTGATCAAGCGGATG	
owi 184	GAATTCCTTGAGCTGGTGGAGATG	Klonierung von pSLB-Chs4-GFP-hom
owi 185	CTGCAGCTCGACTTGTGGAAGCCG	
owi 186	AAGCTTGCAATCTACTGGCGGTCG	
owi 187	CCATGGCGCCTTCTCCAGAGAAAAGCCGC	
owi 169	CTCTAGACGATGCCAAGCATCGCAG	Klonierung von pSLB-Chs5-GFP-hom
owi 170	TCCCATGGCGCCGTCAAAGCTTGAGGAGC	
owi 171	ACGCATGCTGCATCGGAGACGTCAGC	
owi 172	GGAATTCCTCAGCCAGAGTCGTGAG	
owi 188	GAATTCCTAGCAGTCAACGAGGCG	Klonierung von pSLB-Chs6-GFP-hom
owi 189	CTGCAGCAGCGCCTGTCAGTCTAG	
owi 190	AAGCTTGAGTACCAGCGTGAGGTG	
owi 198	CCATGGCGCCGGCTTGTGCGCCACCGGAC	
owi 110	CGCAGCCATATGCAGTATCCATCGGCGGTC	Klonierung von pSLB-Chs7-YFP-hom
owi 119	GCCAAGACATGTCGCCACTGAATCGATCATGATAGC	
owi 112	TCACGCGTGCGACGCACCATGCAATC	
owi 113	TGAAGCTTGGAGTGGTGGACGAGTTG	
owi 114	GCCATCCATATGCGGTGCGTTCGCTCCTGG	Klonierung von pSLB-Mcs1-YFP-hom
owi 120	CCCCATGGCGCCCGACTCGGAGAGAAC	
owi 116	GTACGCGTGTGCGTGTGTTTGCCTGC	
owi 117	TTAAGCTTCGTACCACGTCACTAACCC	

Tabelle 13. Weitere Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendungszweck
owi 47	TCTTTCCGAAGCGAGAGG	Sequenzierung des Cosmids F2F7 (<i>mcs1</i>)
owi 48	GAAGCTCTCGGAAACTCG	
owi 49	CGGCATCTCCTCCAAGTC	
owi 50	GCTTTGGCAAGCGATGGG	
owi 51	GACGCCTCCACTTCTAAG	
owi 52	GGCGAATCGGACCCTTTC	
owi 53	AGGCCCCGATATCCGCATG	
owi 54	TTTCCGAAGGACGAGCGG	
owi 55	GCGACGGCATGATTGTCG	
owi 56	TCCAACGCCAAGGCAAGC	
owi 57	GCTGTCGACCATCATCGC	

Name	Sequenz	Verwendungszweck
owi 58	TCGGTGCGTTCGCTCCTG	Sequenzierung des Cosmids F11G4 (<i>chs7</i>)
owi 59	CACAGCGCACACTCCACC	
owi 61	CGCTTGAGCCACTCACC	
owi 62	ACCACACGCAACGCCATC	
owi 63	CTTTGTCGTTGCCGACGG	
owi 64	GTGGAGAGACGCGCATTG	
owi 65	CCTGTGCGGAACCTTTTG	
owi 66	AACGTCGTCGCGAGTTGG	
owi 71	CACACCCAACACGGAAGC	
owi 72	GGTGGAGAGGCTGAAGAG	
owi 85	TCGGTCTTTGGCGGTGTC	Sequenzierung der Cosmide F2G1, F11C9 (<i>chs2</i>)
owi 83	GGCTTGATGGGCTGCTAC	
owi 98	CCCACGTCTTGAGCGTG	
owi 102	CACGCCAAGAACTTCCG	
owi 103	CCAAGCCCTGCGATGGAC	
owi 104	GCCTCTTCGGACACTGAG	
owi 105	GTAGCCACCTGCGAATGC	
owi 109	GACACGAAGCTCACTTAC	Überprüfung des 3' Endes von <i>chs5</i>
owi 145	CGTCCGTACGTTGTGCAG	
owi 146	CTACGGGACCGTCATCCA	Überprüfung des veröffentlichten Δ <i>chs1</i> -Stamms
owi 123	GCTGGATGAGTGCAGGAG	
owi 124	CTTGACGAACGCTGCAC	Überprüfung der veröffentlichten Δ <i>chs3</i> -Stämme
owi 76	CCCTCTCGCATCAGC	
owi 77	TACGTGGCCAGAAGCGAG	Überprüfung der veröffentlichten Δ <i>chs5</i> -Stämme
owi 79	CGCTCGCAGCAACCTTTC	
owi 80	GCAAAGGCGCCGGAG	Überprüfung der erhaltenen Δ <i>chs6</i> -Stämme
owi 81	ACGCAAGGAGTGCCATCG	
owi 82	TCGCGCACTGATCGCTTC	Überprüfung der veröffentlichten Δ <i>chs4</i> -Stämme
owi 78	CGCTCTACGCCCCAACTTC	
owi 92	CACCTTGACGAGCACGGC	
owi 93	GAGCGCACCAGGACATGA	
owi 37	CAGCGCCTGGATCTTGCA	
owi 38	GCGCTCTACGCCCCAACTT	cDNA Sequenzierung <i>chs2</i>
owi 99	AGGGCGCTGCTATTGTCG	
owi 100	GGCGTGATCTTCCTGTCG	cDNA Sequenzierung <i>chs3</i>
owi 101	GTCGCTGGAATGGCGTGC	
OGW 54	ACATATCTAGCGGCGCCG	Zur Amplifikation von cDNA Enden aus der freireplizierenden cDNA-Bank (Weinzierl, 2001)
OGW 55	TGACGGGTCTGTGCA	
OGW 56	CTGATTTCCACCCTCCCG	
OGW 57	TCTGACCCTTCCGTTGCC	Liegen im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden Cosmidbank (Weinzierl, 2001)
OGW 66	GATGATAAGCGGTCA	
OGW 67	CCTTTCGTCTTCAAG	
OAN 74	GAGCAGTTCATGATGGTAAG	Zur Überprüfung von Integrationsereignissen im <i>ip</i> -Lokus
OAN 75	TTCGAGCTGGTTGCCTGC	
OAN 76	CTATGCGGCATCAGAGCAG	
OAN 77	TTCGCTCTACCGATGCCTT	
OAN 78	TCTCCAAGCCACGGTTCC	
OAN 180	GAGCTGCTCTATAGACTGC	Liegen im Rückgrat von λ gt10
OAN 181	AGACTGCTGGGTAGTCCC	
OAN 182	GGGTAAATAACAGAGGTGGC	
OAN 183	TGGCTTATGAGTATTTCTTCC	

Name	Sequenz	Verwendungszweck
uni 24	ACGACGTTGTAAAAACGACGGCCAG	Zur Sequenzierung von Inserts in pSL1180, pCR®2.1-TOPO®
rev 24	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	

4.1.3 Stämme

4.1.3.1 *E. coli* Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurden die Stämme DH5 α (Hanahan, 1985) und TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei denen es sich um Derivate des *E. coli*-Stammes K12 handelt. Genotyp DH5 α : F' *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15. Genotyp TOP10: F' *mcrA*, Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpSL*(Str^R), *endA1*, *nupG*.

4.1.3.2 *U. maydis* Stämme

In Tabelle 14 sind die Stämme aufgelistet, die in dieser Arbeit als Test- und/oder Ausgangsstämme verwendet wurden. Stämme, die in Tabelle 15 aufgelistet sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Tabelle 14: Ausgangsstämme und andere verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
521	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
AB33	<i>a2 b2 Pnar1::bW2, bE1</i>	B	(Brachmann, 2001)
SG200	<i>a1 mfa2 bW2 bE1, ble^R</i>	B	(Bölker et al., 1995)
FB1mG	<i>a1 b1 /pmfa1GFP</i>	C	(Spellig et al., 1996)
FB2mG	<i>a2 b2 /pmfa1GFP</i>	C	(Spellig et al., 1996)
FB1Y	<i>a1 b1 /pOY</i>	B	(Weber et al., 2003)
FB2C	<i>a2 b2 /pOC</i>	B	(Weber et al., 2003)
FB2 Δ myo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R</i>	H	(Weber et al., 2003)
FB2Myo5 ^{ts}	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R /pMyo5^{ts}</i>	H, C	(Weber et al., 2003)
GS1Myo5 ^{ts}	<i>a1 b1 Δmyo5::hyg^R /pMyo5^{ts}</i>	H, C	(Weber et al., 2003)
FB2MGMyo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R /pMGmyo5</i>	H, C	(Weber et al., 2003)
FB2OGMyo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R /pOGmyo5C</i>	H, C	(Weber et al., 2003)
GS1Myo5 ^{ts} Y	<i>a1 b1 Δmyo5::hyg^R /pMyo5^{ts}/pOY</i>	H, C, B	(Weber et al., 2003)
FB2Myo5 ^{ts} C	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R /pMyo5^{ts}/pOC</i>	H, C, B	(Weber et al., 2003)
SG200 Δ kin2	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δkin2::cbx^R, ble^R</i>	B, C	(Weber et al., 2003)
SG1	<i>a2 b2 Δchs1</i>	H	(Gold und Kronstad, 1994)
FB1 Δ chs3*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1996)
FB2 Δ chs3*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1996)
FB1 Δ chs4*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1996)
FB2 Δ chs4*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1996)
FB1 Δ chs5*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1997)
FB2 Δ chs5*	?		(Xoconostle-Cazares et al., 1997)
FB1 Δ chs6*	<i>a1 b1 Δchs6</i>	H	(Garcerá-Teruel et al., 2004)
FB2 Δ chs6*	<i>a2 b2 Δchs6</i>	H	(Garcerá-Teruel et al., 2004)

Resistenzen: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin.

Δ , Deletion des nachfolgenden Gens; /, ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ::, homologer Austausch; P, Promotor; -, Fusion; *ble^R*, Phleomycin-Resistenzkassette; *hyg^R*, Hygromycin-Resistenzkassette.

* veröffentlichte Chitinsynthase-Deletionsstämme, erhalten von J. Ruiz-Herrera. Überprüfung der Stämme ergab, dass keine Deletion bzw. Disruption der entsprechenden Gene vorlag.

Tabelle 15. In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stammsname	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm/ Herkunft
FB2Myo5 ^{ts} mG	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R/pMyo5^{ts}/pmfa1GFP-B</i>	H, C, B	FB2Myo5 ^{ts}
GS1Myo5 ^{ts} mG	<i>a1 b1 Δmyo5::hyg^R/pMyo5^{ts}pmfa1GFP-B</i>	H, C, B	GS1
FB2Δmyo5mG	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R/pmfa1GFP-B</i>	H, B	FB2Δmyo5
FB2Δmyo5mG-OGMyo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R/pmfa1GFP-B/pOGMyo5H</i>	H, B, C	FB2ΔMyo5mG
FB2Δmyo5mG-MGMyo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R/pmfa1GFP-B/pMGMyo5H</i>	H, B, C	FB2ΔMyo5mG
SG200Δkin2OGMyo5	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δkin2::cbx^R/pOGMyo5H</i>	B, C, H	SG200Δkin2
SG200OGMyo5	<i>a1 mfa2 bW2 bE1/pOGMyo5H</i>	B, H	SG200
FB2GFPMyo5 ^{ts}	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R/pMGMyo5^{ts}</i>	H, C	FB2Δmyo5
FB2Fim1GFP	<i>a2 b2 pfim1-gfp,ble^R</i>	B	FB2
FB2Δchs2	<i>a2 b2 Δchs2::ble^R</i>	B	FB2
FB2Δchs3	<i>a2 b2 Δchs3::ble^R</i>	B	FB2
IW 101	<i>a2 b1 Δchs3::ble^R</i>	B	Kreuzung FB1 x
IW 102	<i>a1 b2 Δchs3::ble^R</i>	B	FB2Δchs3
FB2Δchs4	<i>a2 b2 Δchs4::hyg^R</i>	H	FB2
IW 79	<i>a1 b2 Δchs4::hyg^R</i>	H	
IW 84	<i>a2 b2 Δchs4::hyg^R</i>	H	Kreuzung FB1 x
IW 85	<i>a1 b1 Δchs4::hyg^R</i>	H	FB2Δchs4
IW 86	<i>a2 b1 Δchs4::hyg^R</i>	H	
FB2Δchs5	<i>a2 b2 Δchs5::ble^R</i>	B	FB2
IW 89	<i>a1 b1 Δchs5::ble^R</i>	B	Kreuzung FB1 x
FB2Δchs7	<i>a2 b2 Δchs7::hyg^R</i>	H	FB2
FB1Δchs7	<i>a1 b1 Δchs7::hyg^R</i>	H	FB1
SG200Δchs7	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δchs7::hyg^R</i>	B, H	SG200
AB33Δmcs1	<i>a2 b2 Pnar1:bW2,bE1Δmcs1::hyg^R</i>	B, H	AB33
FB1Δmcs1	<i>a1 b1 Δmcs1::hyg^R</i>	H	FB1
FB2Δmcs1	<i>a2 b2 Δmcs1::hyg^R</i>	H	FB2
SG200 Δmcs1	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δmcs1::hyg^R</i>	B, H	SG200
AB33Δmcs1	<i>a2 b2 Pnar1:bW2,bE1Δmcs1::hyg^R</i>	B, H	AB33
FB2Δchs7 pNEBUC-Chs7	<i>a2 b2 Δchs7::hyg^R + pNEBUC-Chs7</i>	H, C	FB2Δchs7
FB1Δchs7 pNEBUC-Chs7	<i>a1 b1 Δchs7::hyg^R + pNEBUC-Chs7</i>	H, C	FB1Δchs7
FB2Δchs5 pNEBUH-Chs5	<i>a2 b2 Δchs5::ble^R + pNEBUH-Chs5</i>	B, H	FB2Δchs5
FB2Δchs5 pNEBUH	<i>a2 b2 Δchs5::ble^R + pNEBUH</i>	H	FB2Δchs5
FB1Δchs7 pNEBUC	<i>a1 b1 Δchs7::hyg^R + pNEBUC</i>	H, C	FB1Δchs7
FB2 Δchs7 pNEBUC	<i>a2 b2 Δchs7::hyg^R + pNEBUC</i>	H, C	FB2Δchs7
FB2Δchs5 pNEBUC-Chs7	<i>a2 b2 Δchs5::ble^R + pNEBUC-Chs7</i>	B, C	FB2Δchs5
SG200Δmcs1OGMcs1	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs::hyg^R/pOGMcs1</i>	B, H, C	SG200Δmcs1
FB2Chs1GFP	<i>a2 b2 pchs1-gfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs2GFP	<i>a2 b2 pchs2-gfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs3GFP	<i>a2 b2 pchs3-gfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs4GFP	<i>a2 b2 pchs4-gfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs5GFP	<i>a2 b2 pchs5-gfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs6GFP	<i>a2 b2 pchs6-gfp,ble^R</i>	B	FB2
FB2Chs7YFP	<i>a2 b2 pchs7-yfp,hyg^R</i>	H	FB2
AB33Chs7YFP	<i>a2 b2 Pnar1:bW2,bE1 pchs7-yfp,hyg^R</i>	B, H	AB33
FB2Mcs1YFP	<i>a2 b2 pmcs1-yfp,hyg^R</i>	H	FB2
AB33Mcs1YFP	<i>a2 b2 Pnar1:bW2,bE1pmcs1-yfp,hyg^R</i>	B, H	AB33
FB2Mcs1GFP	<i>a2 b2 pmcs1-gfp,hyg^R</i>	H	FB2
FB2Myo5 ^{ts} Mcs1YFP	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R pmcs1-yfp, ble^R/pMyo5^{ts}</i>	H, C, B	FB2Myo5 ^{ts}
FB2Myo5 ^{ts} Chs7YFP	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R pchs7-yfp, ble^R/pMyo5^{ts}</i>	H, C, B	FB2Myo5 ^{ts}
FB2Myo5 ^{ts} Chs5GFP	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R pchs5-gfp, ble^R/pMyo5^{ts}</i>	H, C, B	FB2Myo5 ^{ts}
FB2Myo5 ^{ts} Chs6GFP	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R pchs6-gfp, ble^R/pMyo5^{ts}</i>	H, C, B	FB2Myo5 ^{ts}

Resistenzen: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin.

Δ; Deletion des nachfolgenden Gens/, ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ::, homologer Austausch; P, Promotor; -, Fusion; *ble^R*, Phleomycin-Resistenzkassette, *hyg^R*, Hygromycin-Resistenzkassette, *cbx^R*, Carboxin-Resistenzkassette; +, freireplizierendes Plasmid.

Sämtliche Transformanten wurden durch Southern-Analyse bestätigt. In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanten hergestellt und in den folgenden Experimenten untersucht.

4.1.3.3 Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für alle Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seeds Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

4.1.4 Ausgangsplasmide und Genbanken

Jedes Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft und alle eingebrachten PCR-Produkte, bis auf wenige Ausnahmen, sequenziert.

Tabelle 16: Ausgangsplasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Resistenz	Referenz
pUC19		-	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pBS(+)SK		-	Stratagene
pSP72		-	Promega
pCR [®] 2.1-TOPO [®]		-	Invitrogen
pCR [®] 4.0-TOPO [®]		-	Invitrogen
pNEB193		-	New England Biolabs
pSL1180		-	Pharmacia
pNEB-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann, 2001)
pNEB-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann, 2001)
pSL-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann, 2001)
pSL-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann, 2001)
pNEB-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann, 2001)
pNEB-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann, 2001)
pSL-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann, 2001)
pSL-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann, 2001)
pNEB-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann, 2001)
pNEB-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann, 2001)
pSL-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann, 2001)
pSL-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann, 2001)
pNEB-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann, 2001)
pNEB-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann, 2001)
pSL-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann, 2001)
pSL-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann, 2001)
pNEBUH	<i>Phsp70-hph-Thsp70, Uars</i>	H	(Weinzierl, 2001)
pNEBUC	<i>Phsp70-hph-Thsp70, Uars</i>	C	(Weinzierl, 2001)
pMF1-h(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2003b)
pMF1-h(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2003b)
pMF1-p(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2003b)
pMF1-p(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2003b)
p123	<i>Potef-egfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Christian Aichinger, unveröffentlicht
p123YFP	<i>Potef-yfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
pMyo5 ^{ts}	<i>Pmyo5-myo5^{E534K}, cbx^R</i>	C	(Weber et al., 2003)
pMGmyo5	<i>Pmyo5-egfp-myo5, cbx^R</i>	C	(Weber et al., 2003)
pOGmyo5C	<i>Potef-egfp-myo5, cbx^R</i>	C	(Weber et al., 2003)
pOC	<i>Potef-cfp</i>	B	(Weber et al., 2003)
pMFA-G	<i>Pmfa1-gfp, cbx^R</i>	C	(Spellig et al., 1996)
prGFPTub1	<i>Pcrg1-egfp-tub1</i>	C	(Steinberg et al., 2001)
potefGFPTub1	<i>Potef-egfp-tub1, cbx^R</i>	C	(Steinberg et al., 2001)
pUC18::chs2		B	(Gold und Kronstad, 1994)
pUC18chs2		-	(Gold und Kronstad, 1994)

Resistenzen: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin.

ble-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*; *trpC*-Terminator aus *Aspergillus nidulans*; *nat1*-Gen aus *Streptomyces noursei*; *gap1*-Promotor aus *U. maydis*; *crg1*-Promotor aus *U. maydis*; *mfa1*-Promotor aus *U. maydis*; *cyc1*-Terminator aus *S. cerevisiae*; *hph*-Gen aus *E. coli*; *hsp70*-Promotor und *hsp70*-Terminator aus *U. maydis*; *ip*-Lokus aus *U. maydis*; *otef*-Promotor aus *U. maydis*; *tub1*-Gen α -Tubulin aus *U. maydis*; *myo5*-Gen, Klasse V Myosin aus *U. maydis*; *chs2*-Gen, Chitinsynthase 2 aus *U. maydis*; Uars autonom replizierende Sequenz aus *U. maydis*

λgt10 cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995)

cDNA des Stammes FBD11 (*a1 a2 b1 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA-Kit von Amersham.

Freireplizierende cDNA-Bank (Weinzierl, 2001)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium für 12, 24, und 48 Stunden. Erstellt in Anlehnung an den cDNA Library Kit der Firma Clontech.

Freireplizierende Cosmidbank (Weinzierl, 2001)

Freireplizierende Cosmidbank des Stammes 521 (*a1 b1*) erstellt in Anlehnung an den SuperCos I Cosmid Vector Kit der Firma Stratagene. Sie besteht aus 3840 unabhängigen *E. coli* Klonen, die in 40 Pools á 96 Klone vorliegen.

4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

4.1.5.1 Plasmide für die Lokalisation von GFP-und YFP-Fusionsproteinen

Für alle C-terminalen Fusionsproteine, mit Ausnahme Fim1GFP, wurden die 3'-Enden mittels λgt10 cDNA-Bank und PCR über cDNA des Stammes FB1 näher bestimmt. Im Falle von Fim1 konnte das Gen-Ende anhand der Homologie zu anderen Fimbrinen determiniert werden.

pSLB-Fim1-GFP-hom (#425)

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Fim1 mit GFP durch homologe Rekombination und wurde in einer 5-Fragment-Ligation hergestellt. Dafür wurde der Vektor pSL1180 mit *HindIII* und *NdeI* geöffnet. Die 536 bp lange 5'-ORF-Flanke wurde mittels PCR mit den Primern owi 67 und owi 68 über genomische DNA des Stammes 521 amplifiziert, in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Dabei wurden eine *NdeI*-Schnittstelle am Beginn der ORF-Flanke und eine *NcoI*-Schnittstelle anstelle des Stop-Codons eingefügt. Ebenso wurden 477 bp der 3'-UTR mit den Primern owi 69 und owi 70 vervielfältigt. Dabei wurden eine *SphI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle an den Enden eingefügt. Die kodierende Sequenz von GFP wurde zusammen mit dem *nos*-Terminator als 1034 bp langes *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123-GFP isoliert. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde als 2449 bp langes *BglII*-*SphI*-Fragment aus pNEB-Ble(-) geschnitten. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5190bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs1-GFP-hom (#2959)*

Dieses Plasmid dient der C-terminalen Fusion von Chs1 mit GFP und wurde in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 178 und owi 179 die 5'-ORF-Flanke von *chs1* amplifiziert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde dann in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Zusammen mit einem 1034 bp *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, wurde das 661 bp lange *NcoI*-*HindIII*-Fragment aus pCR[®]2.1-TOPO[®] in einen 2872 bp großen, mit *HindIII* und *BglII* geöffneten, pSL-Hyg(+) zwischenkloniert. Für die anschließende 4-Fragment-Ligation wurde aus diesem Vektor die 5'-ORF-Flanke samt GFP und *nos*-Terminator mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pNEB-Ble(+) als 2423 bp großes *BglII*-*EcoRI*-Fragment isoliert. Wie oben beschrieben wurde mittels PCR mit den Primern owi 176 und owi 177 eine 908 bp lange 3'-UTR amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Dabei wurde an die Enden eine *EcoRI* und *PstI* Schnittstelle eingefügt über die das Fragment wieder herausgeschnitten wurde. Diese drei Fragmente wurden in einen 3356 bp großen *HindIII*-*PstI* geöffneten pSL

Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5763 bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs2-GFP-hom (#3177)*

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Chs2 mit GFP und wurde ähnlich wie pSLB-Chs1-GFP-hom (#2959) in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 194 und owi 195 die 5'-ORF-Flanke von *chs2* amplifiziert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde dann in pCR®4.0-TOPO® kloniert und sequenziert. Zusammen mit einem 1034 bp *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, wurde das 742 bp lange *NcoI*-*HindIII*-Fragment aus pCR®4.0-TOPO® in einen 2872 bp großen, mit *HindIII* und *BglII* geöffneten, pSL-Hyg(+) zwischenkloniert. Für eine die anschließende 4-Fragment-Ligation wurde aus diesem Vektor die 5'-ORF-Flanke samt GFP und *nos*-Terminator mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pNEB-Ble(+) als 2423 bp großes Fragment isoliert. Wie oben beschrieben wurde mittels PCR mit den Primern owi 196 und owi 197 eine 653 bp lange 3'-UTR amplifiziert und in pCR®4.0-TOPO® zwischenkloniert. Dabei wurde an die Enden eine *EcoRI* und *PstI* Schnittstelle eingefügt, über die das Fragment wieder herausgeschnitten wurde. Diese drei Fragmente wurden in einen 3356 bp großen *HindIII*-*PstI* geöffneten pSL Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5593 bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs3-GFP-hom (#3112)*

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Chs3 mit GFP und wurde ähnlich wie pSLB-Chs1-GFP-hom (#2959) in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 182 und owi 183 die 5'-ORF-Flanke von *chs3* amplifiziert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde dann in pCR®2.1-TOPO® kloniert und sequenziert. Zusammen mit einem 1034 bp *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, wurde das 674 bp lange *NcoI*-*HindIII*-Fragment aus pCR®2.1-TOPO® in einen 2872 bp großen, mit *HindIII* und *BglII* geöffneten, pSL-Hyg(+) zwischenkloniert. Für die anschließende 4-Fragment-Ligation wurde aus diesem Vektor die 5'-ORF-Flanke samt GFP und *nos*-Terminator mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pNEB-Ble(+) als 2423 bp großes Fragment isoliert. Wie oben beschrieben wurde mittels PCR mit den Primern owi 180 und owi 181 eine 816 bp lange 3'-UTR amplifiziert und in pCR®2.1-TOPO® zwischenkloniert. Dabei wurde an die Enden eine *EcoRI* und *PstI* Schnittstelle eingefügt, über die das Fragment wieder herausgeschnitten wurde. Diese drei Fragmente wurden in einen 3356 bp großen *HindIII*-*PstI* geöffneten pSL Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5522 bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs4-GFP-hom (#3012)*

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Chs4 mit GFP und wurde ähnlich wie pSLB-Chs1-GFP-hom (#2959) in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 186 und owi 187 die 5'-ORF-Flanke von *chs4* amplifiziert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde dann in pCR®2.1-TOPO® kloniert und sequenziert. Zusammen mit dem 1034 bp *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, wurde das 667 bp lange *NcoI*-*HindIII*-Fragment aus pCR®2.1-TOPO® in einen 2872 bp großen, mit *HindIII* und *BglII* geöffneten, pSL-Hyg(+) zwischenkloniert. Für die anschließende 4-Fragment-Ligation wurde aus diesem Vektor die 5'-ORF-Flanke samt GFP und *nos*-Terminator mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pNEB-Ble(+) als 2423 bp großes Fragment isoliert. Wie oben beschrieben wurde mittels PCR mit den Primern owi 184 und owi 185 eine 765 bp lange 3'-UTR amplifiziert und in pCR®2.1-TOPO® zwischenkloniert. Dabei wurde an die Enden eine *EcoRI* und *PstI* Schnittstelle eingefügt, über die das Fragment wieder herausgeschnitten wurde. Diese drei Fragmente wurden in einen

3356 bp großen *HindIII-PstI* geöffneten pSL Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 4948 bp langes *AgeI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs5-GFP-hom (#3348)*

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Chs5 mit GFP und wurde in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 171 und owi 172 die 726 bp große 3'-UTR-Flanke von *chs5* amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR wurde an den Enden eine *SphI* und *EcoRI* Schnittstelle eingefügt. Zusammen mit einem 2453 bp langen *BglII-SphI*-Fragment aus pNEB-Ble(-), welches die Phleomycin-Resistenzkassette trägt, wurde die aus pCR[®]2.1-TOPO[®] mit *SphI* und *EcoRI* herausgeschnittene 3'-UTR-Flanke in den *BglII-EcoRI* 3224 bp Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Mittels PCR mit den Primern owi 169 und owi 170 wurde eine 641 bp lange 5'-ORF-Flanke amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI* Schnittstelle ersetzt und eine *XbaI* Schnittstelle eingefügt. In einem weiteren Schritt wurde der oben beschriebene Zwischenvektor *BglII-SpeI* (6314 bp) geöffnet und zusammen mit dem 1034 bp *NcoI-BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, und der sequenzierten *NcoI-XbaI*-5'-ORF-Flanke aus pCR[®]2.1-TOPO[®] ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 7603 bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs6-GFP-hom (#3088)*

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Chs6 mit GFP und wurde ähnlich wie pSLB-Chs1-GFP-hom (#2959) in 2 Schritten hergestellt. Zunächst wurde mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern owi 190 und owi 198 die 5'-ORF-Flanke von *chs6* amplifiziert. Dabei wurde das Stop-Codon durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde dann in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Zusammen mit einem 1034 bp *NcoI-BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, wurde das 887 bp lange *NcoI-HindIII*-Fragment aus pCR[®]2.1-TOPO[®] in einen 2872 bp großen, mit *HindIII* und *BglII* geöffneten, pSL-Hyg(+) zwischenkloniert. Für die anschließende 4-Fragment-Ligation wurde aus diesem Vektor die 5'-ORF-Flanke samt GFP und *nos*-Terminator mit *HindIII* und *BglII* ausgeschnitten. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pNEB-Ble(+) als 2423 bp großes Fragment isoliert. Wie oben beschrieben wurde mittels PCR mit den Primern owi 188 und owi 189 eine 654 bp lange 3'-UTR amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Dabei wurde an die Enden eine *EcoRI* und *PstI* Schnittstelle angefügt, über die das Fragment wieder herausgeschnitten wurde. Diese drei Fragmente wurden in einen 3356 bp großen *HindIII-PstI* geöffneten pSL Vektor aus pSL-Ble(-) ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5735 bp langes *SspI*-Fragment transformiert.

pSLH-Chs7-YFP-hom (#1802)

Dieses Plasmid dient der C-terminale Fusion von Chs7 mit YFP und ist in einer 5-Fragment-Ligation hergestellt worden. Mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 wurde mit den Primern owi 110 und owi 119 die 5'-ORF-Flanke amplifiziert. Das Stop-Codon wurde durch eine *AflIII* Schnittstelle ersetzt und eine *NdeI* Schnittstelle eingefügt. Ebenfalls mit PCR über genomische DNA wurde die 3'-UTR mit den Primern owi 112 und owi 113 amplifiziert und dabei eine *MluI* und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Diese dann nachgeschnittenen PCR-Produkte (566 bp und 811 bp groß) wurden dann zusammen mit dem 1034 bp *NcoI-BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, und der 3051 bp langen *BglII-MluI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pSL-Hyg(-) in den 3316 bp langen *HindIII-NdeI* Vektor aus pSL-Hyg(+) ligiert. Anschließend wurde die ORF-Flanke des Plasmids sequenziert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 7190 bp langes *BglII*-Fragment transformiert.

pSLB-Chs7-YFP-hom (#2344)

Dieses Plasmid ist durch Austausch der Hygromycin-Resistenzkassette durch die Phleomycin-Resistenzkassette aus pSLH-Chs7-YFP-hom entstanden. Dafür wurde pSLH-Chs7-YFP-hom partiell mit

NotI verdaut und ein 5888 bp langes Fragment, das nur die Hygromycin-Resistenzkassette nicht mehr enthält, weiterverwendet. Aus dem Vektor pSL-Ble(-) wurde die 2407 bp lange Phleomycin-Resistenzkassette als *NotI-NotI*-Fragment geschnitten und mit dem obigen Vektor ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit *MfeI* linearisiert.

pSLH-Mcs1-YFP-hom (#1780)

Dieses Plasmid wurde ähnlich wie pSLH-Chs7-YFP-hom hergestellt und ermöglicht die C-terminale Fusion von Mcs1 mit YFP. Mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 wurde mit den Primern owi 114 und owi 120 die 5'-ORF-Flanke amplifiziert. Das Stop-Codon wurde durch eine *NcoI* Schnittstelle ersetzt und eine *NdeI* Schnittstelle eingefügt. Ebenfalls mit PCR über genomische DNA wurde die 3'-UTR mit den Primern owi 116 und owi 117 amplifiziert und dabei eine *MluI* und eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Diese dann nachgeschnittenen PCR-Produkte (590 bp und 527 bp groß) wurden dann zusammen mit dem 1034 bp *NcoI-BglII*-Fragment aus p123GFP, das die kodierende Sequenz von GFP mit dem *nos*-Terminator enthält, und der 3051 bp langen *BglII-MluI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pSL-Hyg(-) in den 3316 bp langen *HindIII-NdeI* Vektor aus pSL-Hyg(+) ligiert. Anschließend wurde die ORF-Flanke des Plasmid sequenziert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 6252 bp langes *BspHI*-Fragment transformiert.

pSLB-Mcs1-YFP-hom (#2202)

Dieses Plasmid ist durch Austausch der Hygromycin-Resistenzkassette durch die Phleomycin-Resistenzkassette aus pSLH-Mcs1-YFP-hom entstanden. Dafür wurde pSLH-Mcs1-YFP-hom partiell mit *NotI* verdaut und ein 5623 bp langes Fragment, das nur die Hygromycin-Resistenzkassette nicht mehr enthält, weiterverwendet. Aus dem Vektor pSL-Ble(-) wurde die 2407 bp lange Phleomycin-Resistenzkassette als *NotI-NotI*-Fragment geschnitten und mit dem obigen Vektor ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 5763 bp langes *BspHI*-Fragment transformiert.

pSLH-Mcs1-GFP-hom (#2858)

Dieses Plasmid ist durch Austausch der kodierende Sequenz von YFP durch die kodierende Sequenz von GFP aus pSLH-Mcs1-YFP-hom entstanden. Dafür wurde aus pSLH-Mcs1-YFP-hom durch partiellen Verdau mit *NcoI* und *BsrGI* die kodierende Sequenz von YFP entfernt. Das resultierende 7808 bp lange Fragment wurde mit einem 711 bp *NcoI-BsrGI* aus p123, welches die kodierende Sequenz von GFP enthält, ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde ein 6252 bp langes *BspHI*-Fragment transformiert.

pOGMcs1 (#3314)

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von GFP fusioniert an den N-Terminus des gesamten *mcs1* Gens mit endogenem Terminator unter Kontrolle des *otef*-Promotors und wurde in einer 3-Fragment-Ligation hergestellt. Dazu wurde das *mcs1* Gen und der 3'-UTR als 8180 bp *NdeI-MfeI*-Fragment aus pNEB-Cbx(-) Mcs1 *NdeI* - *MfeI* (#1334) geschnitten. Ein 1665 bp *HindIII-NdeI*-Fragment, das den *otef*-Promotor und die kodierende Sequenz des GFPs enthält, stammt aus *potefGFPTub1*. Aus diesem Plasmid wurde ebenfalls der Vektor als 4342 bp *EcoRI-HindIII*-Fragment verwendet. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit *MfeI* linearisiert.

pOGMyo5H (#3244)

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von GFP und Myo5 inklusive des natürlichen Terminator unter Kontrolle des *otef*-Promotors und ist in einer 2-Fragment-Ligation entstanden. Ein 6854 bp großes *SbfI-HpaI*-Fragment wurde aus pOGMyo5C isoliert und in den *SbfI-PmeI* geöffneten pNEB-Hyg(+) kloniert. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit *SspI* linearisiert.

pMGMyo5^{ts} (#2352)

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von GFP fusioniert an den N-Terminus des Myo5^{ts} Alleles inklusive des natürlichen Promotors und ist in einer 2-Fragment-Ligation entstanden. Ein 1106 bp großes *AscI-AvrII*, die ts-Mutation tragendes Fragment wurde aus p123Myo5^{ts} isoliert und in den *AscI-AvrII*

geöffneten pMGMyo5 kloniert. Das Vorhandensein der ts-Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit *SspI* linearisiert.

* Diese Plasmide entstanden mit Unterstützung von Jan-Heiko Lenz.

4.1.5.2 Plasmide zur Herstellung von Deletionsmutanten

Diese Plasmide wurden in Anlehnung an die in Kämper, 2003 veröffentlichte PCR-Knockout-Strategie hergestellt.

pCRTOPOChs7-KO-H (#606)

1014 bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern owi 45 und owi 46 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *SfiI*-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 882 bp lange 3'-Flanke mit dem Primern owi 43 und owi 44 amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *SfiI*-Schnittstelle generiert. Diese mit *SfiI* nachverdauten PCR-Produkte wurden mit einer 2720 bp großen Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF1-h(+) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR über pCRTOPOChs7-KO-H mit den äußeren Flankenprimern owi 44 und owi45 wurde das KO-Konstrukt amplifiziert und nach Fällung direkt in *U. maydis* transformiert. Die ersten 3069 bp des 3821 bp langen offenen Leserahmens wurden so durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

pCRTOPOMcs1-KO-H (#715)

Dieses Plasmid wurde ähnlich wie pCRTOPOChs7-KO-H hergestellt. Die 988 bp lange 5'-Flanke wurde mit den Primern owi 41 und owi 42 amplifiziert, die 917 bp lange 3'-Flanke mit owi 39 und owi 40. Nach erfolgter Ligation mit einer 2720 bp großen Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF1-h(+) wurde dieses Ligationsprodukt in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Zur Amplifikation des Konstrukts wurden die äußeren Flankenprimer owi 40 und owi 41 verwendet. Mit diesem Konstrukt wurde der komplette offene Leserahmen durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

pCRTOPOMcs1-KO-B (#903)

Dieses Plasmid ist entstanden aus pCR TOPOMcs1-KO-H durch Austausch der Hygromycin-Resistenzkassette gegen eine 2408 bp Phleomycin-Resistenzkassette aus pMF1-p(+). Dafür wurde aus pCRTOPOMcs1-KO-H durch Verdau mit *SfiI* die Hygromycin-Resistenzkassette entfernt und die 2408 bp große Phleomycin-Resistenzkassette hinzuligiert.

pCRTOPOChs3-KO-B

Dieses Plasmid wurde ähnlich wie pCRTOPOChs7-KO-H hergestellt. Die 1136 bp lange 5'-Flanke wurde mit den Primern oda 13 und oda 15 amplifiziert, die 898 bp lange 3'-Flanke mit oda1 und oda 2. Nach erfolgter Ligation mit einer 2408 bp großen Phleomycin-Resistenzkassette aus pMF1-p(-) wurde dieses Ligationsprodukt in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Zur Amplifikation des Konstrukts wurden die äußeren Flankenprimer oda1 und oda 15 verwendet. Mit diesem Konstrukt wurde ab Basenpaar 180 der komplette vorhergesagte offene Leserahmen durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt.

pCRTOPOChs4-KO-H

Dieses Plasmid wurde ähnlich wie pCRTOPOChs7-KO-H hergestellt. Die 1054 bp lange 5'-Flanke wurde mit den Primern oda 8 und oda 7 amplifiziert, die 977 bp lange 3'-Flanke mit oda 4 und oda 5. Nach erfolgter Ligation mit einer 2720 bp großen Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF1-h(-) wurde dieses Ligationsprodukt in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Zur Amplifikation des Konstrukts wurden die äußeren Flankenprimer oda 5 und oda 7 verwendet. Mit diesem Konstrukt wurde ab Basenpaar 286 der komplette vorhergesagte offene Leserahmen durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

pCRTPOChs5-KO-B

Dieses Plasmid wurde ähnlich wie pCRTPOChs7-KO-H hergestellt. Die 942 bp lange 5'-Flanke wurde mit den Primern oda 9 und oda 10 amplifiziert, die 931 bp lange 3'-Flanke mit oda11 und oda 12. Nach erfolgter Ligation mit einer 2408 bp großen Phleomycin-Resistenzkassette aus pMF1-p(+) wurde dieses Ligationsprodukt in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Zur Amplifikation des Konstrukts wurden die äußeren Flankenprimer oda1 und oda 15 verwendet. Mit diesem Konstrukt wurde die Basenpaare 359-4196 bp des 4829 bp langen, vorhergesagten offenen Leserahmens durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt.

4.1.5.3 Weitere Plasmide**pmfa1GFP-B (#2621)**

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz des eGFP unter der Kontrolle des *mfa1*-Promotors und wurde in einer 2-Fragment-Ligation hergestellt. Der *mfa1*-Promotor und die kodierende Sequenz des eGFPs inklusive *nos*-Terminator wurden als 1980 bp *SphI*-*BglII* aus pMFA-G herausgeschnitten und in den *SphI*-*BglII* geöffneten pNEB-Ble(+) kloniert. Für die Transformation in *U. maydis* wurde das Plasmid mit *SspI* linearisiert.

pOY(#2646)

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von YFP mit dem *nos*-Terminator unter Kontrolle des *otef*-Promotors und wurde in einer 2-Fragment-Ligation hergestellt. Dazu wurde der Vektor pSL-Ble(-), der auch die Phleomycin-Resistenzkassette trägt, mit *SphI* und *HpaI* geöffnet und mit einem 2013 bp *SphI*-*HpaI*-Fragment aus p123YFP, das den *otef*-Promotor, die kodierende Sequenz des YFPs und den *nos*-Terminator trägt, ligiert.

pCRTOPOMcs1 (#681)

Dieses Plasmid enthält die ersten 694 bp des *mcs1* Gens und diente der Zwischenklonierung. Mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 wurde mit den Primern owi 90 und owi 47 dieser Bereich amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *NdeI*-Schnittstelle angehängt. Dieses PCR-Produkt wurde in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

pNEB-Cbx(-) Mcs1 BsiWI-PpuMI (#1054)

Dieses Plasmid enthält 1163 bp des vorderen Bereichs des *mcs1* Gens und diente der Zwischenklonierung. Dieses Fragment wurde aus dem Cosmid F2F7 isoliert und dann in den 3966 bp *BsiWI*-*PpuMI* geschnittenen Vektor pNEB-Cbx(-) ligiert.

pNEB-Cbx(-) Mcs1 PpuMI-MfeI (#1215)

Dieses Plasmid enthält 4710 bp des hinteren Bereichs des *mcs1* Gens und 2160 bp der 3'-UTR und diente der Zwischenklonierung. Als 6870 bp *PpuMI*-*MfeI*-Fragment wurde es aus dem Cosmid F2F7 isoliert und in einen *PpuMI*-*MfeI* geöffneten pNEB-Cbx(-) kloniert.

pNEB-Cbx(-) Mcs1 NdeI-MfeI (#1334)

Dieses Plasmid enthält den kompletten kodierenden Bereich des *mcs1* Gens und 2160 bp der 3'-UTR. Es wurde ein 145 bp *NdeI*-*BsiWI*-Fragment aus pCRTOPOMcs1, ein 1163 bp *BsiWI*-*PpuMI*-Fragment aus pNEB-Cbx(-) Mcs1 *BsiWI*-*PpuMI* und ein 6870 bp langes *PpuMI*-*MfeI*-Fragment aus pNEB-Cbx(-) Mcs1 *PpuMI*-*MfeI* in einen pNEB-Cbx(-) *NdeI*-*MfeI* geöffneten Vektor kloniert.

pNEBUC-Chs7

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von Chs7 inklusive des endogenen Promotors und Terminators. Mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern owi 141 und owi 142 wurde ein 6375 bp großes Fragment amplifiziert. Dabei wurden eine *XbaI* und *SacI* Schnittstelle eingefügt. Nach Nachschneiden des PCR-Produkts wurde dieses in den *XbaI*-*SacI* geöffneten freireplizierenden Vektor pNEBUC kloniert.

pNEBUH-Chs5

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von Chs5 inklusive des endogenen Promotors und Terminators. Mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern owi 143 und owi 144 wurde ein 6552 bp großes Fragment amplifiziert. Dabei wurden eine *SphI* Schnittstelle eingefügt. Nach Nachschneiden des PCR-Produkts mit *SphI* und *EcoRI* (interne Schnittstelle) wurde dieses 6539 bp Fragment in den *SphI-EcoRI* geöffneten freireplizierenden Vektor pNEBUH kloniert.

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

4.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Glycerinkulturen wurden in Reaktionsgefäßen durch Mischung einer exponentiell wachsenden Kultur 1:1 mit dYT-Glycerin angesetzt und bei -80°C gelagert. Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

YT-Festmedium (Sambrook et al., 1989)

8 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
16 g Bacto-Agar (Difco)
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Medium (Sambrook et al., 1989)

16 g Trypton
10 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Glycerin (Sambrook et al., 1989)

16 g Trypton
10 g Hefe-Extrakt
800 ml 87% Glycerin
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

4.2.1.3 RbCl Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen et al., 1972. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm

inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37°C horizontal mit 200 Upm geschüttelt. Anschließend wurde 1 min bei 5000 Upm pelletiert, 400 µl des Überstandes abgenommen und die Zellen in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert, auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden

RF1-Lösung

100 mM RbCl
 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 30 mM K-Acetat
 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 15% (v/v) Glycerin
 in ddH₂O
 mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und
 sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 15% (v/v) Glycerin
 in ddH₂O
 mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

4.2.2 *Ustilago maydis***4.2.2.1 Kultivierung von *Ustilago maydis***

Für die Kultivierung von *Ustilago maydis* wurden folgende Medien verwendet:

**AM Ammonium-Minimalmedium
(Holliday, 1974)**

3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
 mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert
 nach dem Autoklavieren:
 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung
 zugesetzt (f. c. 1%)

**NM Nitrat-Minimalmedium
(Holliday, 1974)**

3 g KNO_3
 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
 mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert
 nach dem Autoklavieren:
 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung
 zugesetzt (f. c. 1%)

**CM-Vollmedium
(Holliday, 1974; Banuett und Herskowitz,
1989)**

1,5 g NH_4NO_3
 2,5 g Casamino Acids
 0,5 g DNA
 1 g Yeast Extract
 10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
 mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert
 nach dem Autoklavieren:
 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung
 zugesetzt (f. c. 1%)

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

16 g KH_2PO_4
 4 g NaSO_4
 8 g KCl
 4 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 1,32 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 8 ml Spurenelement-Lösung
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt, sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg	Thiamin
50 mg	Riboflavin
50 mg	Pyridoxin
200 mg	Calciumpantothenat
500 mg	p-Aminobenzoessäure
200 mg	Nikotinsäure
200 mg	Cholinchlorid
1000 mg	Myo-Inositol
mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt, sterilfiltriert	

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)

60 mg	H ₃ BO ₃
140 mg	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
400 mg	ZnCl ₂
400 mg	NaMoO ₄ x 2 H ₂ O
100 mg	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
400 mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt, sterilfiltriert	

PD-Medium

24 g Potato Dextrose Broth
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium

24 g Potato Dextrose Broth
10 g Aktivkohle
20 g Bacto-Agar
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

YEPSL-Medium

(modifiziert nach Tsukuda et al., 1988)

10 g Yeast Extract
10 g Pepton
10 g Saccharose
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), CloNAT (150 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml) und Phleomycin (40 µg/ml). Im Fall der Selektion mit Phleomycin musste zusätzlich TRIS-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da sonst das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.

4.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

4.2.2.3 Induktion regulierbarer Promotoren in *U. maydis*

Die Stämme wurden aus Vorkulturen in Flüssigmedium angeimpft das reprimierende Bedingungen bot (im Falle des *nar1*-Promotors Ammonium-Ionen (AM oder CM) als einzige Stickstoffquelle, im Falle des *crg1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden in PP-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Biofuge Stratos) und im Falle des *nar1*-Promotors zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen frischen Mediums mit den induzierenden Bedingungen resuspendiert, in Schikanekolben überführt und für die gewünschte Zeit bei 28°C inkubiert. Induzierende Bedingungen sind im Falle des *nar1*-Promotors Nitrat-Ionen als einzige Stickstoffquelle, im Falle des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle.

4.2.2.4 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz et al., 1990 und Gillissen et al., 1992. Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPSL-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPSL-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10⁷ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch

verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch zehnminütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen CM-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert.

SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in ddH₂O, sterilfiltriert

STC

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in ddH₂O, sterilfiltriert

STC/PEG

15 ml STC
10 g PEG4000

Regenerationsagar (Schulz et al., 1990)

a) Top-Agar
1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (Tsukuda et al., 1988)
b) Bottom-Agar
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

CM-Regenerationsagar

a) Top-Agar
1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in CM-Medium (Holliday, 1974)
mit 2% Glucose oder 2% Arabinose
b) Bottom-Agar
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

4.2.2.5 Test auf Nikkomycin Z-Hypersensitivität

Der in H₂O gelöste Chitinsynthase-Inhibitor Nikkomycin Z wurde in unterschiedlichen Konzentrationen dem CM-Glucose-Festmedium zugefügt. Zellen wurden über Nacht in CM-Glucose angezogen und die OD₆₀₀ auf 0,5 eingestellt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in einer Mikrotiterplatte schrittweise jeweils um den Faktor 1:10 verdünnt und jeweils 3 µl bzw. 5 µl auf die Nikkomycin Z-haltigen Agarplatten getropft und je nach Versuch bei 20°C oder 28°C inkubiert.

4.2.2.6 Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden in CM-Glucose bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Jeweils 500 µl Kultur wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 1 µg/ml oder nur DMSO zugeben. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Ansätze bei 20°C auf einem Drehrad oder horizontal schüttelnd bei 200 Upm für 6-8 h inkubiert.

4.2.2.7 Konfrontationstest

Diese Methode ist in Snetselaar et al., 1996 näher beschrieben. Die zu testenden Stämme wurden bei 20°C bzw. 28°C mit 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (Heraeus Biofuge) und bis zu einer OD₆₀₀ = 5 in ddH₂O resuspendiert. Objektträger wurden mit 2%igem Wasseragar in einer Höhe von ca. 2 mm beschichtet und je 0,5 µl der Zellsuspension in einer Reihe auf den Objektträger getropft.

Nach Eintrocknung der ersten Reihe wurde der zweite Stamm in einer zweiten Reihe mit einem Abstand von 100-200 µm getropft. Nachdem die zweite Reihe eingetrocknet war, wurde über die Tropfen, die nahe aneinander lagen, sich aber nicht berührten, 3 µl Paraffinöl getropft. Diese Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 20°C bzw. 28°C für 12-14 h inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert.

4.2.2.8 Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

U. maydis Stämme wurden in CM-Glucose-Flüssigmedium über Nacht bis zu einer $OD_{600} = 1$ angezogen. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugation bei 3.500 Upm für 5 min bei RT in einer Heraeus Biofuge), zweimal in ddH₂O gewaschen und anschließend so in ddH₂O aufgenommen, dass in etwa eine Zelldichte von $OD_{600} = 5$ erreicht wurde. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 3-5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft und wenn nicht anders beschrieben für 24-48 h bei 22°C inkubiert.

4.2.2.9 Test auf Pathogenität

Als Pathogenitätstest wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 200-250 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Golden Bantam gespritzt werden. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPSL-Flüssigkultur bis zu einer $OD_{600} = 0,8-1$ angezogen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min Heraeus Biofuge) pelletiert und in ddH₂O zu einer $OD_{600} = 2,0$ aufgenommen. Bei Mischungen wurden diese vor der Infektion im Verhältnis 1:1 gemischt. Etwa 14 Tage nach Infektion erfolgte die Bonitur. Maispflanzen die mit Myo5^{ts}-Zellen und entsprechenden Kontrollstämmen infiziert wurden, wurden in Phytokammern der Firma Conviron bei einer Tagestemperatur von 20°C bzw. 28°C inkubiert.

4.2.2.10 Sporulation und Segregationsanalyse

Von infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5%-igen CuSO₄-Lösung inkubiert um noch eventuell vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspensionen wurden dann auf CM-Glucose-Platten, ausplattiert. Je nach verfolgtem Ziel wurde den Platten Antibiotikum zugesetzt. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6a (*a2 b1*) und FB6b (*a1 b2*) bestimmt.

4.2.3 Fixierung und Anfärbung von Zellen

4.2.3.1 Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 16%iger Formaldehyd-Lösung (EM-Grade, Polyscience) bis zu einer Endkonzentration von 4% direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen.

PBS

7,9 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
14,5 mM	KH ₂ PO ₄
137 mM	NaCl
0,5 mM	MgCl ₂
2,7 mM	KCl
in ddH ₂ O	

4.2.3.2 Herstellung Poly-Lysin beschichteter Deckgläser

Poly-L-Lysin (Sigma) wurde 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. In die Mitte sauberer Deckgläser wurden jeweils etwa 70 µl der verdünnten Poly-Lysin-Lösung pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden ein Teil der Lösung wieder abpipettiert, so dass möglichst nur ein dünner Flüssigkeitsfilm übrig blieb. Die Deckgläser wurden dann bei 60°C getrocknet und konnten daraufhin staubgeschützt, z.B. in einer Petrischale, mehrere Monate aufbewahrt werden.

4.2.3.3 Färbung von neu synthetisiertem Chitin durch WGA

Formaldehyd-fixierte Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge), zweimal in ddH₂O gewaschen, in ddH₂O aufkonzentriert und auf Poly-Lysin beschichtete Deckgläser getropft. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeitsoberfläche einer PBS-gefüllten Petrischale gelegt. Anschließend wurden die Deckgläser in eine Petrischale mit PBS/10 µg/ml „wheat-germ agglutinin“ für einige Minuten inkubiert und daraufhin durch dreimaliges Überführen in frisches PBS gewaschen.

4.2.3.4 Anfärbung der Zellwand durch Calcofluor

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Ein Stück der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, wurde ausgeschnitten und für 1 min in 100 µg/ml Calcofluor in Wasser inkubiert, anschließend gründlich gewaschen und direkt mikroskopiert.

4.2.3.5 Chlorazole Black E Färbung

Zur Auswaschung des Chlorophylls wurden Blattpräparate für ca. 1-2 Tage in 100% Ethanol aufbewahrt und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Für 1-3 h wurden die Präparate dann in 10%iger KOH-Lösung bei 90°C inkubiert. Nach dem Waschen mit ddH₂O wurden die Präparate in 0,03%iger Chlorazole Black E, gelöst in H₂O, Glycerin und Milchsäure im Verhältnis 1:1:1, bei 60°C für ein bis drei Tage inkubiert. Die Präparate wurden dann direkt mikroskopiert oder in 50% Glycerin gelagert.

4.2.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die *in vivo* Beobachtung von *U. maydis*-Zellen wurden 3 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einem Objektträger mit dem gleichen Volumen vorgewärmter 2%iger Low-Melt-Agarose vermischt und sofort mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; Rhodamin, 546 nm und >590 nm; GFP, 450-490 nm und 515-565 nm; YFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CFP, 390-420 nm und >450 nm. Bilder wurden mit gekühlten CCD-Kameras (C4742-25, Hamamatsu und CoolSNAP-HQ, Photometrics) aufgenommen, die von den Programmen ImageProPlus (Media Cybernetics) bzw. MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert wurden. Nachbearbeitung aller Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) erfolgte ebenfalls mit ImageProPlus und MetaMorph. Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden mit Photoshop 6.0 (Adobe) und Corel Draw 9.0 (Corel) durchgeführt. Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad).

Zweidimensionale Deconvolution und Z-Achsen-Projektionen wurden mit MetaMorph durchgeführt. Für die Z-Achsen-Projektion wurden Einzelbilder im 100 nm Abständen mit einer Cool-SNAP CCD Kamera und einem PiEFOC Piezo, mit elektronisch gesteuerter Fokussierung (Physik Instrumente), beides angesteuert durch MetaMorph.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook et al., 1989. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym/RNase-Lösung geschüttelt und anschließend 50 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Plasmid-Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 45 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

STET-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM Na₂-EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in ddH₂O

Lysozym/RNase-Lösung

100 µg/ml RNase
10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in ddH₂O

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

4.3.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch alkalische Lyse. 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (4.000 Upm, 30 min, 4°C, SLA-3000). Das Zellpellet wurde in 5 ml ddH₂O resuspendiert. Alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml Lösung II, Mischen durch vorsichtiges Schwenken und Inkubation für 5 min bei RT. Zur Neutralisation wurden dann 7,5 ml Lösung III zugegeben. Wieder wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die lysierten Zellreste und die denaturierte genomische DNA wurden durch Filtrieren durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll) abgetrennt. Fällung der Nukleinsäuren aus dem Filtrat erfolgte durch Inkubation mit 12 ml Isopropanol in einem 30 ml-Glasröhrchen (Corex) für 10 min bei RT und anschließende Zentrifugation (10.000 Upm, 30min, 4°C, SS-34). Das Pellet wurde in 500 µl ddH₂O aufgenommen und in ein 1,5 ml-Röhrchen überführt. RNA wurde durch Zugabe von 500 µl 5M LiCl, dreimaliges Invertieren und Zentrifugation (13.000 Upm, 10min, RT, Heraeus Biofuge) gefällt. Der Überstand wurde auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt, mit 50 µl 8 M LiCl und 1,1 ml absolutem Ethanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (13.000 Upm, 10min, RT, Heraeus Biofuge), mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 300 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase aufgenommen.

MAXI Lösung II

0,2 M NaOH
1% SDS
in ddH₂O

MAXI Lösung III

3 M Ac, pH 4,8
in ddH₂O

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

4.3.1.3 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston, 1987. Dabei wurden 2 ml einer Übernachtskultur in YEPSL-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 500 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 15 min, RT, Heraeus Biofuge) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml absolutem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 1min, RT, Heraeus Biofuge) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

***Ustilago*-Lysispuffer**

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in ddH₂O

TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD₂₆₀ = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD₂₆₀ zu OD₂₈₀. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.3 In vitro Modifikationen von Nukleinsäuren**4.3.3.1 Restriktionsspaltungen**

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA innerhalb dieser Bereiche. Diese Erkennungssequenzen sind zumeist palindromisch und zwischen 4 und 8 bp lang.

Der sequenzspezifische Verdau von Plasmid-DNA erfolgte durch Aufnahme der DNA im entsprechenden Restriktionspuffer, Zugabe von 1 bis 2 U Enzym pro µg eingesetzter DNA und Inkubation von mindestens 1 h, besser über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Bei einigen Enzymen war es notwendig BSA mit einer Endkonzentration von 100 µg/µl zum Reaktionsansatz zu geben. Einige Restriktionsenzyme konnten durch 20 min Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden.

4.3.3.2 Dephosphorylierung von 5'- und 3'-Enden von DNA-Molekülen

Um zu verhindern, dass geöffnete Vektoren mit sich selbst ligieren und ohne das einzubauende Insert rezirkularisieren, können zuvor mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (Roche) Phosphatgruppen am Ende der DNA-Moleküle entfernt werden. Dazu sollte die DNA im entsprechenden Reaktionspuffer gelöst sein, konnte aber auch direkt nach dem Restriktionsverdau eingesetzt werden. Es wurde 1 µl Alkalische Phosphatase zugegeben, 15 min bei 60°C inkubiert, dann erneut 1 µl Alkalische Phosphatase zugegeben und noch einmal 15 min bei 60°C inkubiert. Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform, 1 min Mischen durch Vortexen. Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min, Biofuge Pico) erreicht. Die wässrige Phase konnte dann abgenommen werden und für die Auftrennung im Agarose-Gel mit Auftragspuffer versetzt werden.

AP-Reaktionspuffer (10x)

100 mM	Tris-HCl, pH 8,3
10 mM	MgCl ₂
10 mM	ZnCl ₂
in ddH ₂ O	

4.3.3.3 DNA-Fällung

Zur Anreicherung von DNA in einer Lösung oder zum Wechseln des Puffers wurde DNA gefällt. Zu der DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen absoluter Ethanol gegeben. Es wurde durch Invertieren gründlich gemischt und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (15 bis 30 min, 20000 Upm, 4°C, Biofuge Stratos), der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Der leicht getrocknete DNA-Niederschlag konnte dann im gewünschten Puffer oder geringerem Volumen aufgenommen werden. Zur Erleichterung des Lösens konnte auf 55°C erwärmt werden.

4.3.3.4 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden neutrale Gele aus Agarose verwendet. Sie erlaubten eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge, wobei die Auflösung je nach Agarose-Konzentration etwa 0,5% der Fragmentgröße betragen kann. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wurde 1 x TAE oder 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei analytischen TBE-Gelen mit bis zu 150 V und bei präparativen TAE-Gelen mit nicht mehr als 80 V durchgeführt. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte während der Elektrophorese durch den dem Gel zugesetzten Farbstoff. Manche Anwendungen machten eine Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Tisch durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar. Als Marker wurde mit *Pst*I oder *Bst*EII restringierte λ-DNA oder die 1 kb-Leiter (New England Biolabs) verwendet.

Auftragspuffer (6x)

50% (w/v)	Saccharose
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
10 mM	Tris-HCl, pH 7,9
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

TBE-Puffer (0,5 x)

50 mM	Tris-Borat, pH 7,9
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

TAE-Puffer (1 x)

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

4.3.3.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die entsprechende Bande wurde auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell markiert. Es war darauf zu achten, dass eine niedrige Strahlungsintensität eingestellt war und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wurde. Die Bande wurde dann in einem möglichst geringen Agarose-Volumen ausgeschnitten und in eine abgeschnittene 1 ml-Pipettenspitze mit Filtereinsatz (Precision Tips, Biozym) überführt. Dann wurde die Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und 5 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde sodann pelletiert (20.000 Upm, 30 min, 4°C , Biofuge Stratos), mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen. Um das Lösen der DNA zu beschleunigen und DNasen zu inaktivieren, wurde 20 min bei 55°C und 700 Upm in einem Heizblock (Eppendorf) inkubiert.

4.3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Ligationsansatz enthielt die äquimolare Mischung aller restringierter und gereinigter DNA-Fragmente in einem Volumen von 8 μl . Dazu wurden 1 μl 10x Ligase-Puffer und 1 μl T4-Ligase (Roche) gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde gemischt und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Ligase-Puffer (10x)

666 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	MgCl_2
10 mM	ATP
10 mM	DTT
in ddH ₂ O	

Alternativ wurde die T4-Quick-Ligase (NEB) mit entsprechendem mitgeliefertem Puffer verwendet und der Ligationsansatz 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf dem natürlichen Vervielfältigungsmechanismus der DNA. Damit können bestimmte DNA-Segmente, deren benachbarte Sequenzen bekannt sind, spezifisch amplifiziert werden. Gegen diese beiden Regionen werden komplementäre Oligonukleotide (Primer) eingesetzt. Als DNA-Polymerase werden die hitzebeständige *Taq*-Polymerase oder eine *Pfu*-Polymerase verwendet. Letztere besitzt zusätzlich zur Polymerase-Aktivität auch noch eine Endonuklease-Aktivität, die eine Fehlerkorrektur bei der Synthese erlaubt und so fehlerfreie PCR-Produkte ermöglicht.

Die Polymerase-Kettenreaktion fand vielfältige Anwendung in dieser Arbeit. Sie ist eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen und eignet sich daher zum Durchmustern transformierter Organismen ebenso, wie für die Detektion heterologer Sequenzen mit übereinstimmenden flankierenden Bereichen. Sie wurde benutzt, um Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen bereitzustellen. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Vorlagen-DNA übereinstimmten, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthielten.

4.3.4.1 Standard-PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz (Innis et al., 1990) enthielt etwa 10 ng Vorlagen-DNA (Template), die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 μM , dNTPs in einer Endkonzentration von 200 μM (d. h. je 200 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), außerdem der Reaktionspuffer mit MgCl_2 mit einer Endkonzentration von 1,5 mM. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 μl durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Die *Taq*-Polymerase sollte erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben werden. Für einen 50 μl -

Ansatz empfiehlt es sich, 2 U Enzym einzusetzen. PCR-Ansätze mit *Pfu*-DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC 200, MJ Research). Es wurde zunächst für 3 min bei 94°C denaturiert, dann erfolgten 35 Zyklen mit jeweils 45 sec Denaturierung bei 94°C, 45 sec Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 10 min bei 72°C. Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst.

dNTP mix

10 mM dATP
10 mM dCTP
10 mM dGTP
10 mM dTTP
in ddH₂O

10x PCR-Puffer (*Taq*-DNA-Polymerase)

500 mM DMSO
100 mM Tris-HCl, pH 8,3
15 mM MgCl₂

10x PCR-Puffer

(*Pfu*-DNA-Polymerase, Promega)

200 mM Tris-HCl, pH 8,8
100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
20 mM MgSO₄
1 mg/ml nuclease-free BSA
1% TritonX-100

4.3.4.2 Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *U. maydis*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl ddH₂O resuspendiert und davon jeweils 1,5 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *U. maydis*-Zellen zu erreichen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Folgende Punkte sind jedoch zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als zwei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gingen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hatte, nicht verloren. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt.

4.3.5 Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden verschiedene Techniken angewendet. Am einfachsten war dabei die Amplifikation der Enden aus cDNA-Bibliotheken, wie z. B. der λgt10-Bank oder der freireplizierenden cDNA-Bank. Während bei der ersten die Orientierung der inserierten Fragmente nicht festgelegt ist, sind die cDNA-Moleküle in der zweiten Bibliothek für Volllänge-Fragmente angereichert und gerichtet kloniert. Die Amplifikationen wurden in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente aus der ersten Reaktion in einem zweiten Ansatz mit intern gelegenen Oligonukleotiden reamplifiziert wurden. In Fällen, in denen sich kein eindeutiges Bandenmuster zeigte, wurden die aufgetrennten Fragmente auf Nylonmembranen transferiert und mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Oligonukleotide für die Amplifikationen waren im Fall der λgt10-Bank OAN180 und OAN181 bzw. OAN182 und OAN183, im Fall der freireplizierenden cDNA-Bank OGW54 und OGW55 bzw. OGW56 und OGW57.

4.3.6 TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die *Taq*-Polymerase hängt template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen[®]) enthält überhängende 3'-Desoxythymidin-Reste. Dadurch können PCR-Produkte sehr effizient in den Vektor eingebaut werden. Das TOPO-Cloning[™]-Kit von Invitrogen[®] nutzt die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus.

2,5 µl eines gereinigten PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl pCR[®]-TOPO-Vektor versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde kurz zentrifugiert und das Gefäß auf Eis gesetzt.

Ein Gefäß kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit dem TOPO-Reaktionsansatz versetzt, vorsichtig gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 60 s bei 42°C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt. Es wurden 500 µl dYT-Medium zugegeben und das verschlossene Gefäß horizontal bei 37°C und 200 Upm für 30 min bebrütet. Der gesamte Transformationsansatz wurde dann auf eine YT-Platte mit Ampicillin und X-Gal verteilt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 12 h wurden die weißen oder leicht blauen Kolonien gepickt, in Flüssigmedium angezogen und die Plasmide präpariert.

4.3.7 Nachweis von Nukleinsäuren

4.3.7.1 Screening der Cosmidbankfilter

Die Membranen der Cosmidbank (Weinzierl, 2001) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Die spezifische Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 65°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Probes) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven „Screens“ der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet. Zunächst wurde ein Masterfilter hergestellt, auf den DNA der 40 Pools getropft worden war, und dieser hybridisiert. Zeigten ein oder mehrere Pools ein starkes Hybridisierungssignal, wurden die entsprechenden Poolfilter ausgewählt und erneut hybridisiert. Jeder Poolfilter bestand aus 96 Einzelklonen. Klone die nach Hybridisierung ein starkes Signal aufwiesen wurden aus Glycerinkultur aufgeweckt und die entsprechende DNA isoliert.

Southern-Hybridisierungspuffer

50 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM	PIPES
100 mM	NaCl
1 mM	Na ₂ -EDTA
5% (w/v)	SDS
in ddH ₂ O	

Southern-Waschpuffer

1x	SSC
0,1% (w/v)	SDS
in ddH ₂ O	

4.3.7.2 Herstellung radioaktiver Hybridisierungs sonden

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von α³²P-dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Für das Screening der Cosmidbankfilter nach *chs7* und *mcs1* wurden PCR-Produkte radioaktiv markiert, die mit folgenden Primern amplifiziert wurden: Für *chs7*: owi 32 x owi 33; Für *mcs1*: owi 29 x 30.

Für *chs2* wurde aus dem Plasmid pUC18chs2 ein *Xba*I-*Hind*III-Fragment verwendet.

4.3.7.3 Nachweis von Nukleinsäuren im Southern-Blot

4.3.7.3.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Sonden wurden durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP während der PCR markiert. Ein Ansatz enthielt 10 bis 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR DIG Labeling Mix, je 20 pmol der beiden Primer und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase. Mit Reinstwasser wurde auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog zur Standard-PCR. Das Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt.

PCR DIG Labeling Mix

2 mM	dATP
2 mM	dCTP
2 mM	dGTP
1,9 mM	dTTP
0,1 mM	alkali-labile DIG-11-dUTP, pH 7,0
in ddH ₂ O	

4.3.7.3.2 Transfer und Nachweis der DNA (Southern, 1975)

Von jedem Transformanten wurden 1 bis 5 µg vollständig restringierte genomische DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Als Vergleich wurde restringierte Wildtyp-DNA mit auf das Gel geladen. Die Elektrophorese sollte bei nicht mehr als 50 V erfolgen, um eine schöne Auftrennung der Banden zu erreichen. Das Gel wurde dann auf dem UV-Tisch zusammen mit einem Lineal fotografiert, um ein Zuordnen der Markerbanden zu ermöglichen.

Das Gel wurde dann in eine Schale gelegt. Sollten Fragmente größer als 10 kb transferiert werden, wurde die DNA durch kontrollierte Säurebehandlung depuriniert. Dafür wurde das Gel bei Raumtemperatur für maximal 10 min in 250 mM HCl geschüttelt. Das Gel wurde dann mit 0,4M NaOH neutralisiert, gleichzeitig wurde die DNA denaturiert. Der Transfer der DNA vom Gel auf die HybondTM-N+-Membran (Amersham Life Science) erfolgte durch einen Kapillarblot mit 0,4M NaOH als Transferlösung über Nacht. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung mit 1200 mJ/cm² im UV-Crosslinker auf der noch feuchten Membran fixiert, diese dann auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde der Filter in eine Hybridisierungsröhre gesteckt, wobei die DNA-Seite nach innen zeigte. Dann wurde der Filter mit 10 bis 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C für ca. 30 min prähybridisiert. Die Dig-markierte Sonde (ca. 10 µl des PCR-Ansatzes mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt) wurde 10 min bei 99°C denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Dann wurde zweimal für 15 min mit 50 ml Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in eine Schale gelegt, langsam bei Raumtemperatur geschwenkt und mit den folgenden Lösungen inkubiert:

Zweimal 5 min in Dig-Waschpuffer.

30 min Dig2.

30 min in Antikörperlösung.

Dreimal 20 min in Dig-Waschpuffer.

5 min in Dig3.

In einem aufgeschnittenen Polyethylenschlauch wurde die Membran anschließend für 5 min mit 5 ml Chemolumineszenz-Lösung inkubiert. Dann wurde sie kurz zwischen Whatman-Papier getrocknet und in noch feuchtem Zustand luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurde die eingeschweißte Membran zusammen mit einem Film in eine lichtdichte Kassette überführt. Normalerweise reichten Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis 120 min aus. Der Film wurde entwickelt.

Southern-Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
 50 mM PIPES
 100 mM NaCl
 1 mM Na₂-EDTA
 5% (w/v) SDS
 in ddH₂O

Southern-Waschpuffer

1x SSC
 0,1% (w/v) SDS
 in ddH₂O

Dig1

100 mM Maleinsäure
 150 mM NaCl
 in ddH₂O, mit NaOH pH 7,5 einstellen

Dig2

2% (w/v) Magermilchpulver
 in Dig1

Antikörperlösung

1:20000 Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente
 (Roche)
 in Dig2

Dig-Waschpuffer

0,3% Tween-20
 in Dig1

Dig3 (frisch ansetzen)

100 mM Tris-HCl, pH 9,5
 100 mM NaCl
 in ddH₂O

Chemolumineszenz-Lösung

1:100 CPD-Star (Roche)
 in Dig3

4.3.8 Sequenz- und Strukturanalyse

Die Protein-Sequenzen der Chitinsynthasen, Myosine und Fimbrin-Homologe wurden von Pubmed (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) oder der Myosin-Homepage (URL: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>) geladen, in ClustalX (Thompson et al., 1997) verglichen und aneinander ausgerichtet. Die genomische Sequenz von *U. maydis* wurde zur Verfügung gestellt von der Bayer Crop Science AG und dem Whitehead Institut und können unter folgenden Angabe heruntergeladen werden (URL: http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/):

Tabelle 17: Chitinsynthase-Sequenzen.

Chitinsynthase	Contig	Bereich des ORFs (5'→3')
<i>chs1</i>	206	9871 → 12570
<i>chs2</i>	150	211452 → 214091
<i>chs3</i>	9	199800 → 196981
<i>chs4</i>	9	154920 → 157745
<i>chs5</i>	86	41216 → 36390
<i>chs6</i>	103	110363 → 113902
<i>chs7</i>	197	50760 → 54578
<i>mcs1</i>	108	211640 → 205626

Sequenzen der Myosin-Chitinsynthasen von *Phanerochaete crysogenum* stammten vom DOE Joint Genome Institute (URL: <http://www.jgi.doe.gov/index.html>), von *Neurospora crassa* vom Whitehead Institut (URL: <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>). Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden mit MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001) durchgeführt. Stammbäume wurden mit der Methode "Minimum Evolution" konstruiert. Dabei wurde ein "Nearest neighbor joining"-Baum als Startpunkt und 1000 Bootstrap-,Replicates" verwendet.

Weitere Sequenzanalysen erfolgten mit:

- PEST-FIND (Rogers et al., 1986; Rechsteiner, 1990; Rechsteiner und Rogers, 1996) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein
- SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1 (ABI) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen
- SMART (Schultz et al., 1998; Schultz et al., 2000) zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur

- SOSUI (URL: <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) zur Vorhersage von Transmembrandomänen
- HMMTOP (URL: <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) zur Vorhersage von Transmembrandomänen (Tusnady und Simon, 1998, 2001)
- TMPRED (URL: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) zur Vorhersage von Transmembrandomänen
- DNA-STRIDER 1.3 (Marck, 1988; Douglas, 1995) und CLONEMANAGER zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Planung von Klonierungen
- BLAST2 (Gish und States, 1993; Madden et al., 1996; Altschul et al., 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken
- COILS (URL: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html, (Lupas et al., 1991) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas
- PAIRCOIL (Berger et al., 1995) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Berger
- CLUSTALX (Thompson et al., 1997) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen
- GENEDOC (Nicholas und Nicholas, 1997) zur Bearbeitung von Alignments (Schattierungen, Export als Enhanced Metafile) und Berechnung der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Proteinen

4.4.1.1 Proteinpräparation aus *U. maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde normalerweise aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, SLA-3000), in 5 ml PB1 aufgenommen und in ein 15 ml-PP-Röhrchen überführt, dann erneut abzentrifugiert (2.800 Upm, 5 min, 4°C, Biofuge Stratos), mit 2 ml PB2 gewaschen und schließlich in 1 ml PB2 aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (23.300 Upm, 30 min, 4°C, Biofuge Stratos), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert.

PB1

100 mM PIPES; pH 6,9
 5 mM $MgSO_4$
 1 mM Na_2 -EDTA
 5 mM Na_2 -EGTA
 in ddH_2O

PB2

10 ml PB1
 1 Tablette Complete Mini EDTA-free (Roche)

Probenpuffer (6x)

300 mM Tris-Cl, pH 8,0
 30% (v/v) Glycerin
 20% (w/v) SDS
 0,5 g/l Bromphenolblau
 15% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
 in ddH_2O

Probenpuffer (1x)

1/6 Probenpuffer in PB1

4.4.1.2 Miniproteinpräparation aus *U. maydis*

Für die Proteinisolation in kleinem Maßstab, die allerdings nur für Proteine bis 100 kDa geeignet ist, wurden 2 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (3.000 Upm, 2 min, 4°C, Biofuge pico). Die Zellen wurden mit 500 µl PB1 gewaschen, in 1x Probenpuffer aufgenommen, mit 0,3 g Glasperlen versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 10 min auf dem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min, RT, Biofuge pico) abgetrennt. Der Überstand wurde direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

4.4.2.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden so an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean 3 Apparatur (Biorad) bei 20 bis 30 mA für 1,5 h aufgetrennt. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit 5% bis zu 15% Polyacrylamid verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Sammelgel

125 mM	Tris-Cl, pH 6,8
5% (w/v)	Acrylamid
0,13% (w/v)	Bisacrylamid
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v)	TEMED
in ddH ₂ O	

Trenngel

375 mM	Tris-Cl, pH 8,8
5% bis 15% (w/v)	Acrylamid
0,27% (w/v)	Bisacrylamid
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v)	TEMED
in ddH ₂ O	

Proteingel-Laufpuffer

25 mM	Tris-Cl, pH 8,8
200 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS
in ddH ₂ O	

Coomassie-Färbelösung

0,25% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
50% (v/v)	Methanol
7,5% (v/v)	Essigsäure
in ddH ₂ O	

Entfärbe-Lösung

7,5% (v/v)	Methanol
7,5% (v/v)	Essigsäure
in ddH ₂ O	

4.4.2.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Nass-Blots auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. In die Blot-Kammer (Hoefer) wurden 1 l kalter (4°C) Towbin-Puffer vorgelegt. Der Blot wurde in einer Schale mit 0,5 l Towbin-Puffer folgendermaßen zusammengebaut: Auf das schwarze Gitter wurde ein Whatman-Papier (10 x 7,5 cm) gelegt und mit Puffer getränkt. Darauf wurde das Polyacrylamidgel gelegt, gefolgt von der in Towbin-Puffer äquilibrierten Nitrozellulose-Membran und einem weiteren Whatman-Papier. Das weiße Gitter wurde nun auf den Stapel gepresst und das gesamte Sandwich in die Blot-Kammer gesteckt. Bis zu vier Blots wurden auf diese Weise gebaut und hintereinander in die Blot-Kammer

gesteckt. An die Kammer wurden 100 V und 400 mA für 30 min (Proteine bis 80 kDa) oder 60 min so angelegt, dass die weißen Gitter jeweils zum Pluspol zeigten.

Towbin-Puffer

25 mM Tris-Base
129 mM Glycine
0,05% SDS
20% Methanol
in ddH₂O

4.4.2.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, anschließend noch dreimal 5 min mit TBST gewaschen und dann für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, und anschließend erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde die ECL-Lösung frisch aus den Komponenten ECL A, B und C sowie Wasserstoffperoxid angesetzt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 1 h Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST

20 mM Tris-HCl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,7 % Tween-20
0,00025 % Thimerosal
In ddH₂O

PBS

7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
14,5 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
0,5 mM MgCl₂
2,7 mM KCl
In ddH₂O

ECL A

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
In ddH₂O

ECL B

90 mM Coumarinsäure (Sigma C-9008)
in DMSO, Aliquots bei -20°C lagern

ECL C

250 mM Luminol (FLUKA 09253)
in DMSO, Aliquots bei -20°C lagern

ECL-Lösung

20 ml ECL A
44 µl ECL B
100 µl ECL C
6 µl H₂O₂

Für die Detektion wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärer AK: Antigen: GFP (Maus), bezogen von Roche, verwendete Konzentrationen 1:3000-1:5000

Sekundärer AK: Antigen: IgG aus Maus gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, bezogen von Promega, verwendete Konzentration 1:5000.

5 Literaturverzeichnis

- Adams, A.E. und Pringle, J.R.** (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **98**, 934-945.
- Akashi, T.; Kanbe, T. und Tanaka, K.** (1994). The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans*. *Microbiology* **140** (Pt 2), 271-280.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Amnuaykanjanasin, A. und Epstein, L.** (2003). A class V chitin synthase gene, *chsA* is essential for conidial and hyphal wall strength in the fungus *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*). *Fungal Genet Biol* **38**, 272-285.
- Archer, D.B.** (1977). Chitin biosynthesis in protoplasts and subcellular fractions of *Aspergillus fumigatus*. *Biochem J* **164**, 653-658.
- Ausubel, F.M.; Brenz, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. und Strukl, K.** (1987). *Current Protokols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Ayscough, K.R. und Drubin, D.G.** (1998). A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signalling. *Curr Biol* **8**, 927-930.
- Ayscough, K.R.; Stryker, J.; Pokala, N.; Sanders, M.; Crews, P. und Drubin, D.G.** (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**, 399-416.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**, 149-170.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1999). Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet Biol* **27**, 119-127.
- Bartnicki-Garcia, S.; Bartnicki, D.D. und Gierz, G.** (1995). Determinants of fungal cell wall morphology: The vesicle supply center. *Can J Bot* **73**, S372-S378.

- Bartnicki-Garcia, S.; Bracker, C.E.; Gierz, G.; Lopez-Franco, R. und Lu, H.** (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophys J* **79**, 2382-2390.
- Basse, C.W. und Steinberg, G.** (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol*, in Druck.
- Berger, B.; Wilson, D.B.; Wolf, E.; Tonchev, T.; Milla, M. und Kim, P.S.** (1995). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8259-8263.
- Bezanilla, M.; Wilson, J.M. und Pollard, T.D.** (2000). Fission yeast myosin-II isoforms assemble into contractile rings at distinct times during mitosis. *Curr Biol* **10**, 397-400.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*-a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- Bölker, M.; Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bölker, M.; Genin, S.; Lehmler, C. und Kahmann, R.** (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- Borgia, P.T.; Iartchouk, N.; Riggle, P.J.; Winter, K.R.; Koltin, Y. und Bulawa, C.E.** (1996). The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet Biol* **20**, 193-203.
- Bowen, A.; Chen-Wu, J.; Momany, M.; Young, R.; Szaniszlo, P. und Robbins, P.** (1992). Classification of fungal chitin synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 519-523.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A.; Schirawski, J.; Muller, P. und Kahmann, R.** (2003a). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**, 2199-2210.
- Brachmann, A.; König, J.; Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2003b). Reverse genetic approach to generate gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **eingereicht**.
- Bracker, C.E.; Ruiz-Herrera, J. und Bartnicki-Garcia, S.** (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4570-4574.
- Braun, P.C. und Calderone, R.A.** (1978). Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. *J Bacteriol* **133**, 1472-1477.
- Brefeld, O.** (1883). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie **Heft 5**, 67-75.
- Brown, S.S.** (1997). Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 44-48.
- Brundett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T. und Malajcuk, N.** (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centro for International Agricultural Research, Canberra, Australia **Monograph 32**.
- Bulawa, C.E.; Slater, M.; Cabib, E.; Au-Young, J.; Sburlati, A.; Adair, W.L., Jr. und Robbins, P.W.** (1986). The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46**, 213-225.
- Cabib, E.** (1991). Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 170-173.

- Cabib, E.; Shaw, J.A.; Mol, P.C.; Bowers, B. und Choi, W.-J.** (1996). Chitin biosynthesis and morphogenic processes. In *The Mycota III*, R. Brambl und G.A. Marzluf, eds (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 243-267.
- Catlett, N.L. und Weisman, L.S.** (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14799-14804.
- Catlett, N.L.; Duex, J.E.; Tang, F. und Weisman, L.S.** (2000). Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *J Cell Biol* **150**, 513-526.
- Causier, B.E.; Milling, R.J.; Foster, S.G. und Adams, D.J.** (1994). Characterization of chitin synthase from *Botrytis cinerea*. *Microbiology* **140** (Pt 9), 2199-2205.
- Chigira, Y.; Abe, K.; Gomi, K. und Nakajima, T.** (2002). chsZ, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* **41**, 261-267.
- Choi, W.J.; Santos, B.; Duran, A. und Cabib, E.** (1994). Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol Cell Biol* **14**, 7685-7694.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Chuang, J.S. und Schekman, R.W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**, 597-610.
- Cohen, E.** (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* **57**, 946-950.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Coluccio, L.M.** (1997). Myosin I. *Am J Physiol* **273**, C347-359.
- Cos, T.; Ford, R.A.; Trilla, J.A.; Duran, A.; Cabib, E. und Roncero, C.** (1998). Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**, 419-426.
- Coue, M.; Brenner, S.L.; Spector, I. und Korn, E.D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* **213**, 316-318.
- Cruz, J.A.; Garcia, R.; Rodriguez-Orengo, J.F. und Rodriguez-Medina, J.R.** (2000). Increased chitin synthesis in response to type II myosin deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**, 20-25.
- de Nobel, H.; van Den Ende, H. und Klis, F.** (2000). Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol* **8**, 344-345.
- Debono, M. und Gordee, R.S.** (1994). Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Ann Rev Microbiol* **48**, 471-497.
- DeGiorgis, J.A.; Reese, T.S. und Bearer, E.L.** (2002). Association of a nonmuscle myosin II with axoplasmic organelles. *Mol Biol Cell* **13**, 1046-1057.
- DePina, A.S. und Langford, G.M.** (1999). Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech* **47**, 93-106.
- Desrivieres, S.; Cooke, F.T.; Parker, P.J. und Hall, M.N.** (1998). MSS4, a Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 15787-15793.
- Din, A.B.; Specht, C.A.; Robbins, P.W. und Yarden, O.** (1996). chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **250**, 214-222.
- Ding, D.; Tomita, Y.; Yamamoto, A.; Chikashige, Y.; Haraguchi, T. und Hiraoka, Y.** (2000). Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cell* **5**, 189-190.

- Douglas, C.M.; Foor, F.; Marrinan, J.A.; Morin, N.; Nielsen, J.B.; Dahl, A.M.; Mazur, P.; Baginsky, W.; Li, W.; el-Sherbeini, M. und et al.** (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12907-12911.
- Douglas, S.E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- Doyle, T. und Botstein, D.** (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3886-3891.
- Estrada, P.; Kim, J.; Coleman, J.; Walker, L.; Dunn, B.; Takizawa, P.; Novick, P. und Ferro-Novick, S.** (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **163**, 1255-1266.
- Flores Martinez, A. und Schwencke, J.** (1988). Chitin synthetase activity is bound to chitosomes and to the plasma membrane in protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **946**, 328-336.
- Ford, R.A.; Shaw, J.A. und Cabib, E.** (1996). Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and of a homologous moiety essential for function. *Mol Gen Genet* **252**, 420-428.
- Fujiwara, M.; Horiuchi, H.; Ohta, A. und Takagi, M.** (1997). A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 75-78.
- Fujiwara, M.; Ichinomiya, M.; Motoyama, T.; Horiuchi, H.; Ohta, A. und Takagi, M.** (2000). Evidence that the *Aspergillus nidulans* class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophore development. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 359-366.
- Garcerá-Teruel, A.; Xoconostle-Cazares, B.; Rosas-Quijano, R.; León-Ramírez, C.; Specht, C.A.; Sentandreu, R. und Ruiz-Herrera, J.** (2004). Loss of virulence in *Ustilago maydis* mutants affected in the chitin synthase gene *umchs6*. *Res Microbiol* **akzeptiert**.
- Garcia-Muse, T.; Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- Gaughran, J.P.; Lai, M.H.; Kirsch, D.R. und Silverman, S.J.** (1994). Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *J Bacteriol* **176**, 5857-5860.
- Geli, M.I. und Riezman, H.** (1998). Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci* **111 (Pt 8)**, 1031-1037.
- Gillissen, B.; Bergemann, J.; Sandmann, C.; Schröer, B.; Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gish, W. und States, D.J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-272.
- Gold, S. und Kronstad, J.** (1994). Disruption of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **11**, 897-902.
- Gooday, G.W.** (1994). Cell walls. In *The growing fungus*, N.A.R. Gow und M.G. Geoffrey, eds (London: Chapman and Hall), pp. 43-62.
- Goodman, A.; Goode, B.L.; Matsudaira, P. und Fink, G.R.** (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**, 2617-2629.
- Goodson, H. und Spudich, J.** (1995). Identification and molecular characterization of a yeast myosin I. *Cell Motil Cytoskeleton* **30**, 73-84.

- Goodson, H.; Anderson, B.; Warrick, H.; Pon, L. und Spudich, J.** (1996). Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **133**, 1277-1291.
- Govindan, B.; Bowser, R. und Novick, P.** (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol* **128**, 1055-1068.
- Gruber, C.** (1998). Analyse eines Myosins der Klasse V aus *U. maydis*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Gulick, A.M.; Bauer, C.B.; Thoden, J.B. und Rayment, I.** (1997). X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628.
- Haarer, B.K.; Petzold, A.; Lillie, S.H. und Brown, S.S.** (1994). Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J Cell Sci* **107** (Pt 4), 1055-1064.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In DNA cloning, a practical approach, D. Rickwood und B.D. Hames, eds (IRL Press), pp. 109-135.
- Heath, I.B.** (1995). Integration and regulation of hyphal tip growth. *Can J Bot* **73**, S131-S139.
- Heath, I.B.; Gupta, G. und Bai, S.** (2000). Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **30**, 45-62.
- Heath, I.B.; Bonham, M.; Akram, A. und Gupta, G.D.** (2003). The interrelationships of actin and hyphal tip growth in the ascomycete *Geotrichum candidum*. *Fungal Genet Biol* **38**, 85-97.
- Hill, K.L.; Catlett, N.L. und Weisman, L.S.** (1996). Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **135**, 1535-1549.
- Hoffman, C.S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, ed (New York, USA: Plenum Press), pp. 575-595.
- Holthuis, J.C.; Nichols, B.J. und Pelham, H.R.** (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* **9**, 3383-3397.
- Horiuchi, H.; Fujiwara, M.; Yamashita, S.; Ohta, A. und Takagi, M.** (1999). Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of csmA, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **181**, 3721-3729.
- Houdusse, A.; Kalabokis, V.N.; Himmel, D.; Szent-Gyorgyi, A.G. und Cohen, C.** (1999). Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell* **97**, 459-470.
- Huang, J.D.; Brady, S.T.; Richards, B.W.; Stenolen, D.; Resau, J.H.; Copeland, N.G. und Jenkins, N.A.** (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* **397**, 267-270.
- Hwang, E.; Kusch, J.; Barral, Y. und Huffaker, T.C.** (2003). Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol* **161**, 483-488.
- Ikonen, E.; de Almeida, J.B.; Fath, K.R.; Burgess, D.R.; Ashman, K.; Simons, K. und Stow, J.L.** (1997). Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of

- p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci* **110** (Pt 18), 2155-2164.
- Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. und White, T.J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA: Academic Press).
- Jansen, R.P.; Dowzer, C.; Michaelis, C.; Galova, M. und Nasmyth, K.** (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**, 687-697.
- Johnston, G.C.; Prendergast, J.A. und Singer, R.A.** (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol* **113**, 539-551.
- Kahmann, R.; Basse, C. und Feldbrugge, M.** (1999). Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Curr Opin Microbiol* **2**, 647-650.
- Kalebina, T.S.; Farkas, V.; Laurinavichiute, D.K.; Gorlovoy, P.M.; Fominov, G.V.; Bartek, P. und Kulaev, I.S.** (2003). Deletion of BGL2 results in an increased chitin level in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**, 179-184.
- Kamada, T.; Bracker, C.E. und Bartnicki-Garcia, S.** (1991). Chitosomes and chitin synthetase in the asexual life cycle of *Mucor rouxii*: spores, mycelium and yeast cells. *J Gen Microbiol* **137** (Pt 6), 1241-1252.
- Kämper, J.** (2003). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **akzeptiert**.
- Kämper, J.; Reichmann, M.; Romeis, T.; Bolker, M. und Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Karcher, R.L.; Roland, J.T.; Zappacosta, F.; Huddleston, M.J.; Annan, R.S.; Carr, S.A. und Gelfand, V.I.** (2001). Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* **293**, 1317-1320.
- Kim, M.K.; Park, H.S.; Kim, C.H.; Park, H.M. und Choi, W.** (2002). Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast* **19**, 341-349.
- Kliche, W.; Fujita-Becker, S.; Kollmar, M.; Manstein, D.J. und Kull, F.J.** (2001). Structure of a genetically engineered molecular motor. *EMBO J* **20**, 40-46.
- Kovar, D.R.; Gibbon, B.C.; McCurdy, D.W. und Staiger, C.J.** (2001). Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta* **213**, 390-395.
- Kubler, E. und Riezman, H.** (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* **12**, 2855-2862.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. und Nei, M.** (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, W.-L.; Bezanilla, M. und Pollard, T.D.** (2000). Fission Yeast Myosin-I, Myo1p, Stimulates Actin Assembly by Arp2/3 Complex and Shares Functions with WASp. *J. Cell Biol.* **151**, 789-800.
- Lehmle, C.; Steinberg, G.; Snetselaar, K.M.; Schliwa, M.; Kahmann, R. und Bolker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-3473.
- Lillie, S.H. und Brown, S.S.** (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **125**, 825-842.

- Long, R.M.; Singer, R.H.; Meng, X.; Gonzalez, I.; Nasmyth, K. und Jansen, R.-P.** (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383-387.
- Lupas, A.; Van Dyke, M. und Stock, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Madden, T.L.; Tatusov, R.L. und Zhang, J.** (1996). Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol* **266**, 131-141.
- Madrid, M.P.; Di Pietro, A. und Roncero, M.I.** (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* **47**, 257-266.
- Marck, C.** (1988). 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* **16**, 1829-1836.
- Martinez-Espinoza, A.D.; Garcia-Pedrajas, M.D. und Gold, S.E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Martin-Garcia, R.; Duran, A. und Valdivieso, M.H.** (2003). In *Schizosaccharomyces pombe* chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett* **549**, 176-180.
- McGoldrick, C.A.; Gruver, C. und May, G.S.** (1995). myoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128**, 577-587.
- Mellado, E.; Aufauvre-Brown, A.; Gow, N.A. und Holden, D.W.** (1996a). The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* **20**, 667-679.
- Mellado, E.; Specht, C.A.; Robbins, P.W. und Holden, D.W.** (1996b). Cloning and characterization of chsD, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **143**, 69-76.
- Mellado, E.; Dubreucq, G.; Mol, P.; Sarfati, J.; Paris, S.; Diaquin, M.; Holden, D.W.; Rodriguez-Tudela, J.L. und Latge, J.P.** (2003). Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **38**, 98-109.
- Mermall, V.; Post, P.L. und Mooseker, M.S.** (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-533.
- Minehardt, T.J.; Marzari, N.; Cooke, R.; Pate, E.; Kollman, P.A. und Car, R.** (2002). A classical and ab initio study of the interaction of the myosin triphosphate binding domain with ATP. *Biophys J* **82**, 660-675.
- Mio, T.; Yabe, T.; Sudoh, M.; Satoh, Y.; Nakajima, T.; Arisawa, M. und Yamada-Okabe, H.** (1996). Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**, 2416-2419.
- Miyazaki, A. und Ootaki, T.** (1997). Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeana*. *J Gen Appl Microbiol* **43**, 333-340.
- Motegi, F.; Arai, R. und Mabuchi, I.** (2001). Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* **12**, 1367-1380.
- Mulvihill, D.P. und Hyams, J.S.** (2003). Role of the two type II myosins, Myo2 and Myp2, in cytokinetic actomyosin ring formation and function in fission yeast. *Cell Motil Cytoskeleton* **54**, 208-216.
- Munro, C.A. und Gow, N.A.** (2001). Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **39 Suppl 1**, 41-53.

- Munro, C.A.; Winter, K.; Buchan, A.; Henry, K.; Becker, J.M.; Brown, A.J.; Bulawa, C.E. und Gow, N.A.** (2001). Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* **39**, 1414-1426.
- Musch, A.; Cohen, D. und Rodriguez-Boulan, E.** (1997). Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol* **138**, 291-306.
- Nagahashi, S.; Sudoh, M.; Ono, N.; Sawada, R.; Yamaguchi, E.; Uchida, Y.; Mio, T.; Takagi, M.; Arisawa, M. und Yamada-Okabe, H.** (1995). Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 13961-13967.
- Nagata, Y. und Burger, M.M.** (1974). Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* **249**, 3116-3122.
- Neco, P.; Gil, A.; Del Mar Frances, M.; Viniegra, S. und Gutierrez, L.M.** (2002). The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J* **368**, 405-413.
- Neuhaus, E.M. und Soldati, T.** (2000). A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J Cell Biol* **150**, 1013-1026.
- Nicholas, K.B. und Nicholas, H., B. Jr.** (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Nino-Vega, G.; Munro, C.; San-Blas, G.; Gooday, G. und Gow, N.** (2000). Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **38**, 31-39.
- Oberholzer, U.; Marcil, A.; Leberer, E.; Thomas, D.Y. und Whiteway, M.** (2002). Myosin I is required for hypha formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**, 213-228.
- Oshero, N.; Yamashita, R.A.; Chung, Y.S. und May, G.S.** (1998). Structural requirements for in vivo myosin I function in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**, 27017-27025.
- Osmond, B.C.; Specht, C.A. und Robbins, P.W.** (1999). Chitin synthase III: Synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11206-11210.
- Park, I.C.; Horiuchi, H.; Hwang, C.W.; Yeh, W.H.; Ohta, A.; Ryu, J.C. und Takagi, M.** (1999). Isolation of csm1 encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain from the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **170**, 131-139.
- Popolo, L.; Gilardelli, D.; Bonfante, P. und Vai, M.** (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 463-469.
- Prassler, J.; Stocker, S.; Marriott, G.; Heidecker, M.; Kellermann, J. und Gerisch, G.** (1997). Interaction of a *Dictyostelium* member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes. *Mol Biol Cell* **8**, 83-95.
- Pruyne, D. und Bretscher, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. II. The role of the cortical actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **113**, 571-585.
- Puhalla, J.E.** (1968). Compatible reaction s on solid medium and interstrain inhibition of *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- Rechsteiner, M.** (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol* **1**, 433-440.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S.W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-271.

- Reck-Peterson, S.L.; Tyska, M.J.; Novick, P.J. und Mooseker, M.S.** (2001). The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol* **153**, 1121-1126.
- Riquelme, M.; Gierz, G. und Bartnicki-Garcia, S.** (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146** (Pt 7), 1743-1752.
- Riquelme, M.; Reynaga-Pena, C.G.; Gierz, G. und Bartnicki-Garcia, S.** (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* **24**, 101-109.
- Rodriguez, J.R. und Paterson, B.M.** (1990). Yeast myosin heavy chain mutant: maintenance of the cell type specific budding pattern and the normal deposition of chitin and cell wall components requires an intact myosin heavy chain gene. *Cell Motil Cytoskeleton* **17**, 301-308.
- Rodriguez-Medina, J.R.; Cruz, J.A.; Robbins, P.W.; Bi, E. und Pringle, J.R.** (1998). Elevated expression of chitinase 1 and chitin synthesis in myosin II-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**, 919-925.
- Rogers, S.; Wells, R. und Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Roh, D.H.; Bowers, B.; Schmidt, M. und Cabib, E.** (2002). The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2747-2759.
- Rossanese, O.W.; Reinke, C.A.; Bevis, B.J.; Hammond, A.T.; Sears, I.B.; O'Connor, J. und Glick, B.S.** (2001). A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **153**, 47-62.
- Ruiz-Herrera, J. und Martinez-Espinoza, A.D.** (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *Int Microbiol* **1**, 149-158.
- Ruiz-Herrera, J. und Martinez-Espinoza, A.D.** (1999). Chitin biosynthesis and structural organization *in vivo*. In *Chitin and Chitinases*, P. Jolles und R.A.A.A. Muzzarelli, eds (Basel: Birkhäuser), pp. 39-53.
- Ruiz-Herrera, J. und San-Blas, G.** (2003). Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**, 77-91.
- Sambrook, J.; Frisch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sandrock, T.M.; Brower, S.M.; Toenjes, K.A. und Adams, A.E.** (1999). Suppressor analysis of fimbrin (Sac6p) overexpression in yeast. *Genetics* **151**, 1287-1297.
- Santos, B. und Snyder, M.** (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**, 95-110.
- Saraste, M.; Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-434.
- Sburlati, A. und Cabib, E.** (1986). Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **261**, 15147-15152.
- Schauwecker, F.; Wanner, G. und Kahmann, R.** (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- Schnepf, E.** (1986). Cellular polarity. *Annu Rev Plant Physiol* **37**, 23-47.
- Schott, D.; Ho, J.; Pruyn, D. und Bretscher, A.** (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol* **147**, 791-808.

- Schultz, J.; Milpetz, F.; Bork, P. und Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- Schultz, J.; Copley, R.R.; Doerks, T.; Ponting, C.P. und Bork, P.** (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- Schulz, B.; Banuett, F.; Dahl, M.; Schlesinger, R.; Schäfer, W.; Martin, T.; Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Seiler, S.; Nargang, F.E.; Steinberg, G. und Schliwa, M.** (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**, 3025-3034.
- Shannon, K.B. und Li, R.** (2000). A myosin light chain mediates the localization of the budding yeast IQGAP-like protein during contractile ring formation. *Curr Biol* **10**, 727-730.
- Shaw, J.A.; Mol, P.C.; Bowers, B.; Silverman, S.J.; Valdivieso, M.H.; Duran, A. und Cabib, E.** (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114**, 111-123.
- Sietsma, J.H. und Wessel, J.H.G.** (1994). Apical wall biogenesis. In *The Mycota I*, J.H.G. Wessel und F. Meinhardt, eds (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 126-141.
- Sietsma, J.H.; Wösten, H.A.B. und Wessel, J.H.G.** (1995). Cell wall growth and protein secretion in fungi. *Can J Bot* **73**, S388-395.
- Sietsma, J.H.; Beth Din, A.; Ziv, V.; Sjollem, K.A. und Yarden, O.** (1996). The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **142** (Pt 7), 1591-1596.
- Silverman, S.J.; Sburlati, A.; Slater, M.L. und Cabib, E.** (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4735-4739.
- Singer, S.J. und Nicholson, G.L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Smith, C.A. und Rayment, I.** (1996). X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404-5417.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M.; Bölker, M. und Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Specht, C.A.; Liu, Y.; Robbins, P.W.; Bulawa, C.E.; Iartchouk, N.; Winter, K.R.; Riggle, P.J.; Rhodes, J.C.; Dodge, C.L.; Culp, D.W. und Borgia, P.T.** (1996). The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol* **20**, 153-167.
- Spellig, T.; Bottin, A. und Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.

- Spellig, T.; Bolker, M.; Lottspeich, F.; Frank, R.W. und Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- Steinberg, G.** (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends in Microbiol* **8**, 162-168.
- Steinberg, G.; Wedlich-Soldner, R.; Brill, M. und Schulz, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-622.
- Steinberg, G.; Schliwa, M.; Lehmler, C.; Bolker, M.; Kahmann, R. und McIntosh, J.** (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111**, 2235-2246.
- Straube, A.; Brill, M.; Oakley, B.R.; Horio, T. und Steinberg, G.** (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: Polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **14**, 642-657.
- Straube, A.; Enard, W.; Berner, A.; Wedlich-Soldner, R.; Kahmann, R. und Steinberg, G.** (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* **20**, 5091-5100.
- Tahirovic, S.; Schorr, M.; Then, A.; Berger, J.; Schwarz, H. und Mayinger, P.** (2003). Role for lipid signaling and the cell integrity MAP kinase cascade in yeast septum biogenesis. *Curr Genet* **43**, 71-78.
- Tariq, V.N. und Devlin, P.L.** (1996). Sensitivity of fungi to nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol* **20**, 4-11.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. und Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Tolliday, N.; Pitcher, M. und Li, R.** (2003). Direct evidence for a critical role of myosin II in budding yeast cytokinesis and the evolvability of new cytokinetic mechanisms in the absence of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**, 798-809.
- Torralba, S.; Raudaskoski, M.; Pedregosa, A.M. und Laborda, F.** (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **144** (Pt 1), 45-53.
- Toya, M.; Motegi, F.; Nakano, K.; Mabuchi, I. und Yamamoto, M.** (2001). Identification and functional analysis of the gene for type I myosin in fission yeast. *Genes Cells* **6**, 187-199.
- Tsukuda, T.; Carleton, S.; Fotheringham, S. und Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Tusnady, G.E. und Simon, I.** (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* **283**, 489-506.
- Tusnady, G.E. und Simon, I.** (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-850.
- Tuxworth, R.I. und Titus, M.A.** (2000). Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic* **1**, 11-18.
- Uchida, Y.; Shimmi, O.; Sudoh, M.; Arisawa, M. und Yamada-Okabe, H.** (1996). Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. II: Both full size and processed enzymes are active for chitin synthesis. *J Biochem (Tokyo)* **119**, 659-666.

- Urban, M.; Kahmann, R. und Bolker, M.** (1996). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- Valdivia, R.H. und Schekman, R.** (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10287-10292.
- Valdivia, R.H.; Baggott, D.; Chuang, J.S. und Schekman, R.W.** (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* **2**, 283-294.
- Valdivieso, M.H.; Duran, A. und Roncero, C.** (1999). Chitin synthases in yeast and fungi. In *Chitin and Chitinases*, P. Jolles und R.A.A.A. Muzzarelli, eds (Basel: Birkhäuser), pp. 55-69.
- Valdivieso, M.H.; Mol, P.C.; Shaw, J.A.; Cabib, E. und Duran, A.** (1991). CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **114**, 101-109.
- Valverde, M.E.; Paredes Lopez, O.; Pataky, J.K. und Guevara Lara, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source-biology, composition, and production. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**, 191-229.
- Vermeulen, C.A. und Wessels, J.G.** (1986). Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. *Eur J Biochem* **158**, 411-415.
- Volkman, N.; DeRosier, D.; Matsudaira, P. und Hanein, D.** (2001). An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J Cell Biol* **153**, 947-956.
- Waddle, J.; Karpova, T.; Waterston, R. und Cooper, J.** (1996). Movement of cortical actin patches in yeast. *J Cell Biol* **132**, 861-870.
- Wang, Z.; Zheng, L.; Hauser, M.; Becker, J.M. und Szaniszlo, P.J.** (1999). WdChs4p, a homolog of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*, alone cannot support growth of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* at the temperature of infection. *Infect Immun* **67**, 6619-6630.
- Watts, F.; Shiels, G. und Orr, E.** (1987). The yeast MYO1 gene encoding a myosin-like protein required for cell division. *EMBO J* **6**, 3499-3505.
- Weber, I.; Gruber, C. und Steinberg, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- Wedlich-Soldner, R.; Bolker, M.; Kahmann, R. und Steinberg, G.** (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-1986.
- Wedlich-Soldner, R.; Straube, A.; Friedrich, M.W. und Steinberg, G.** (2002a). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946-2957.
- Wedlich-Soldner, R.; Schulz, I.; Straube, A. und Steinberg, G.** (2002b). Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **13**, 965-977.
- Weinzierl, G.** (2001). Isolierung und Charakterisierung der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Wessels, J.H.G.** (1986). Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int Rev Cytol* **104**, 37-79.
- Wessels, J.H.G.** (1988). A steady-state model for apical wall growth in fungi. *Acta Bot Neerl* **37**, 3-16.

- Wessels, J.H.G.** (1990). Role of cell wall architecture in fungal tip growth generation. In *Tip growth in plant and fungal cells*, I.B. Heath, ed (San Diego, CA, USA: Academic Press), pp. 1-29.
- Win, T.Z.; Gachet, Y.; Mulvihill, D.P.; May, K.M. und Hyams, J.S.** (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci* **114**, 69-79.
- Wollert, T.; DePina, A.S.; Sandberg, L.A. und Langford, G.M.** (2001). Reconstitution of active pseudo-contractile rings and myosin-II-mediated vesicle transport in extracts of clam oocytes. *Biol Bull* **201**, 241-243.
- Woo, M.; Lee, K. und Song, K.** (2003). MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 195-202.
- Wu, Q.; Sandroock, T.M.; Turgeon, B.G.; Yoder, O.C.; Wirsal, S.G. und Aist, J.R.** (1998). A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**, 89-101.
- Xoconostle-Cazares, B.; Leon-Ramirez, C. und Ruiz-Herrera, J.** (1996). Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. *Microbiology* **142**, 377-387.
- Xoconostle-Cazares, B.; Specht, C.A.; Robbins, P.W.; Liu, Y.; Leon, C. und Ruiz-Herrera, J.** (1997). Umchs5, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **22**, 199-208.
- Yabe, T.; Yamada-Okabe, T.; Nakajima, T.; Sudoh, M.; Arisawa, M. und Yamada-Okabe, H.** (1998). Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem* **258**, 941-947.
- Yamashita, R.A. und May, G.S.** (1998). Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**, 14644-14648.
- Yanai, K.; Kojima, N.; Takaya, N.; Horiuchi, H.; Ohta, A. und Takagi, M.** (1994). Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1828-1835.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yarden, O. und Yanofsky, C.** (1991). Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **5**, 2420-2430.
- Yin, H.; Pruyne, D.; Huffaker, T.C. und Bretscher, A.** (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* **406**, 1013-1015.
- Zhang, Z. und Gurr, S.J.** (2000). Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. *Gene* **253**, 145-150.
- Ziman, M.; Chuang, J.S. und Schekman, R.W.** (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909-1919.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt Gero für die mir gewährten Freiräume, für seine tatkräftige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Regine Kahmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anfertigen zu dürfen, sowie für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Renkawitz-Pohl für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Herrn Maier und Michael Bölker für die freundliche Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.

Für Diskussionen, Ratschläge, Unterstützungen und eine nette Zeit möchte ich mich besonders bei meinem Labor bedanken: Bei Dani vor allem für die nette und witzige Boxennachbarschaft, aber auch für die Unterstützung bei der Herstellung einiger Chitinsynthase-KOs, bei Anne für ihre zahlreichen Hilfestellungen und bei Jan-Heiko für die Unterstützung meines Projektes während seines Praktikums. Auch Lubi, Roland, Gagan und Uta sei für die nette Zusammenarbeit gedankt. Isabel danke ich für ihre große Unterstützung und Hilfe bei vielen Dingen, für nette Gespräche und gute Ratschläge, nicht nur im Labor.

Außerhalb des C-Labs möchte ich mich besonders bei Georgi, Jörg, Feldi, Philip M., Olli, Gerhard und Siegi nicht nur für ihre fachliche Unterstützung sehr bedanken! Dem P-Lab und K-Lab danke ich für die gute Zusammenarbeit auf B1. Gavin für nette Schnacks, Christoph für die nette Labor-Unterhaltung abends oder am Wochenende, Hedwig für die gute Laune. Heiko danke ich besonders für seine Unterstützung und eine schöne, lustige gemeinsame Zeit. Kathrin und Jan sei von Herzen für die Freundschaft und Hilfe bei besonderen Anlässen gedankt. Volker danke ich für die netten „gemeinsamen“ Isotopenkontrolldienste, Florian für Ratschläge in der Proteinbiochemie, Ria für ihre Hilfe in der Spülküche und bei täglichen Kleinigkeiten. Ein dickes Dankeschön gilt auch Philip B. für viele schöne Abende, einen „schon ganz schönen“ Provence-Urlaub und seine großartige Hilfsbereitschaft. Thomas, Jan. F., Jan. S. und Heiko danke ich u. a. für die tolle Zeit in Kalifornien. Und natürlich allen, an dieser Stelle nicht genannten Kahmännern und -frauen ein herzliches Dankeschön!

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern und André, die mich während dieser Zeit grenzenlos unterstützt haben und auch in weniger schönen Momenten immer für mich da waren.

DANKE!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Isabella Anna Katharina Weber
geboren am 29.11.1974 in Hüttental-Weidenau (jetzt Siegen)

Schulbildung

1981 – 1985 St. Franziskus Grundschule Friesenhagen
1985 – 1994 Hollenberg-Gymnasium Waldbröl
Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,2)

Studium

10/1994 – 03/2000 Studium der Biologie und Ökotoxikologie an der Universität Bonn
06/1998 – 03/1999 Diplom- und Staatsexamensarbeit
am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit
der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in
Berlin (Dr. Nirenberg) und
am Institut für Zoologie der Universität Salzburg (Prof. Foissner)
Titel: "Biologische Kontrolle des phytopathogenen Pilzes *Colletotrichum cf. acutatum* f. *sp. lupini* durch pilzliche und bakterielle Antagonisten und
mycophage Ciliaten".
11/1999 1. Staatsexamen in Biologie und Ökotoxikologie
Sekundarstufe II-Note: 1,3
03/2000 Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie
Gesamtnote: 1,3

Promotion

01/2001 – 12/2003 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der
Abteilung „Organismische Interaktionen“ von Prof. Kahmann,
Arbeitsgruppe „Zelluläre Mikrobiologie“ von PD Dr. G. Steinberg
Thema: Die Bedeutung von Myo5 für das polare Wachstum, die pathogene
Entwicklung und den Transport polarer Chitinsynthasen in *Ustilago maydis*.

Sonstiges

02/1997 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
06/2000 – 08/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der SaKa-Ragis Pflanzenzucht GbR,
Eckernförde
09/2000 – 12/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Genetik und Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians Universität, München

Marburg, den 03. Februar 2004